



HAL
open science

Etude du phénomène d'adhésion chez la larve d'huître creuse *Crassostrea gigas* au stade pédivéligère

Valentin Foulon

► **To cite this version:**

Valentin Foulon. Etude du phénomène d'adhésion chez la larve d'huître creuse *Crassostrea gigas* au stade pédivéligère. Autre [q-bio.OT]. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2018. Français. NNT : 2018BRES0094 . tel-02130552v1

HAL Id: tel-02130552

<https://theses.hal.science/tel-02130552v1>

Submitted on 15 May 2019 (v1), last revised 15 May 2019 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 598
Sciences de la Mer et du littoral
Spécialité : *Biologie Marine*

Par

Valentin FOULON

**Étude du phénomène d'adhésion chez la larve d'huître creuse
Crassostrea gigas au stade pédivéligère.**

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 12 Décembre 2018
Unité de recherche : Laboratoire des sciences de l'environnement marin UMR6539

Rapporteurs avant soutenance :

Pascal FAVREL Professeur,
 Université de Caen
 Normandie

Romana SANTOS Chercheure,
 Université de Lisbonne

Composition du Jury :

Président du jury
Pascal-Jean LOPEZ CR CNRS, Museum National
 d'Histoire Naturelle Paris

Directeur de thèse
Claire HELLIO Professeure, Université de Bretagne
 Occidentale

Co-directeurs de thèse
Fabienne GUERARD Professeure, Université de Bretagne
 Occidentale

Pierre BOUDRY Chercheur, Ifremer Brest

Remerciements

Je souhaite remercier l'ensemble des personnes ayant participé de près ou de loin à ces trois années de thèse.

Je remercie le directeur de laboratoire Luis Tito de Morais de m'avoir accueilli au LEMAR.

Je remercie également Romana Santos et Pascal Favrel d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit de thèse, ainsi que Pascal Jean Lopez d'avoir examiné ce travail lors de la soutenance.

Je remercie tout particulièrement mes trois encadrants, Claire, Fabienne et Pierre, pour avoir proposé ce sujet de thèse, pour m'avoir donné l'opportunité d'en faire partie, et pour la confiance que vous m'avez donnée. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec vous sur ce sujet de recherche passionnant et nouveau au laboratoire. Merci à vous trois pour vos conseils et anecdotes, pour votre soutien, vos encouragements, et pour les nombreux échanges enrichissants que nous avons pu avoir. Merci également pour la grande liberté que vous m'avez donnée sur ce travail. J'espère que nous retravaillerons ensemble un jour.

Merci également à toute l'équipe d'Argenton, Bruno, Marc, Stéphane, Isa, Jacqueline, Dominique, Mathias, Carole, et les autres que j'oublie... pour m'avoir fourni une montagne de bébés huître, pour avoir aussi épuisé les blagues autour de la colle d'huître..., et sans qui tout ce travail n'aurait pas vu le jour.

Merci à Alain et toute l'équipe de la plateforme H2P2, de m'avoir accueilli pour microdisséquer mes huîtres et quand la machine était en panne de m'avoir proposé de découper du cervau humain et de jouer avec le microscope RAMAN ! Merci à Gérard, Philippe et Anne pour avoir partagé la passion de la microscopie, pour tous vos conseils et pour les belles images que nous avons réalisées. Merci à Kada, pour m'avoir initié à la microscopie FTIR.

Merci aussi à Caroline, pour nos nombreuses discussions sur l'histologie des larves d'huître et pour tes conseils dans les manip. Merci à Seb d'avoir fait marcher (parfois...) la nanoLC et le spectro de masse, de m'avoir supporté avec mes nombreuses petites questions, de m'avoir fait découvrir la protéo dans un labo à 30°C et merci pour tous tes encouragements !

Merci au secrétariat du LEMAR et de l'EDSML, Gene, Anne-So et Yves, Elisabeth tous les papiers administratifs, les devis, les commandes, les signatures... vous êtes géniaux !

Merci à mes copains, il en a plein, ceux du bureau, merci de n'avoir jamais rien dit quand ma combi séchait sur l'étagère, merci de m'avoir supporté ! Merci aussi à tous les autres, pour les nombreux

moments de rigolades, pour tous les cafés du matin, pour ceux de l'après-midi, pour ma constance au ping pong, pour les parties de pêche, pour les élevages de chaton, pour les calculs géographiques afin savoir si c'est bien le phare de Sein que l'on voit par la fenêtre (oui c'est bien lui !), pour avoir fait avec moi matin et soir un peu plus de 10 000km à vélo dans la joie et la bonne humeur. A ceux que j'ai dû oublier, merci aussi.

Merci à ma famille, de m'avoir transmis l'intérêt pour la nature et cette passion pour la mer, depuis tout petit. Merci de m'avoir soutenu dans cette voie, merci pour tout. Merci à Estelle, toi qui partage ma vie, qui n'a pas hésité à me suivre « où il pleut tout le temps », et qui rend ma vie si agréable. Merci d'avoir fait la vaisselle quand je rédigeais (la dernière semaine, 3 fois).

Merci à tous ceux qui sont venus partager ma présentation, et à tous ceux qui étaient avec moi par la pensée.

Merci à tous c'était vraiment génial, et ce n'est pas fini !

Sommaire

Avant propos	1
Liste des publications et communications scientifiques	3
 CHAPITRE I - Introduction générale.....	5
1 Colles et adhésifs, définitions.....	7
1.1 Historique et production mondiale des adhésifs	7
1.2 Paramètres définissant un adhésif	8
1.3 Les colles synthétiques.....	11
1.3.1 Les colles époxydes	11
1.3.2 Les colles polyuréthanes	12
1.3.3 Les colles acryliques	12
1.3.4 Les colles à base de solvant.....	13
1.4 Développement de colles naturelles.....	13
1.4.1 Le biomimétisme	13
1.4.2 Exemples de bioadhésifs biomimétiques	15
2 Stratégies d'adhésion, et organismes modèles.....	15
2.1 Exemples d'adhésion mécanique et réversible : le gecko, le poulpe et le rémora.....	16
2.1.1 Adhésion chez le gecko	16
2.1.2 Adhésion chez le poulpe.....	17
2.1.3 Adhésion chez les rémoras.....	18
2.2 Adhésion chimique, réversible ou irréversible, chez nombre d'organismes	19
2.2.1 Adhésion chimique chez les plantes.....	19
2.2.2 Sécrétions adhésives chez les arachnides et autres arthropodes.....	20
2.2.3 Adhésion réversible chez les mollusques terrestres	20
2.2.4 Adhésion réversible chez certains vertébrés	21
3 Les bioadhésifs dans le milieu marin.....	21
3.1 Bactéries et microorganismes	22
3.2 Macroalgues	23
3.3 Crustacés	24
3.4 Polychètes	25
3.5 Echinodermes.....	25

3.6	Mollusques	27
3.6.1	Organe d'adhésion : le pied.....	27
3.6.2	Le byssus, bioadhésif modèle	28
4	L'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i> , nouveau modèle d'étude de la bioadhésion	30
4.1	Répartition géographique et élevage.....	30
4.2	Reproduction et développement	31
5	Problématiques scientifiques et objectifs	33
CHAPITRE II - Matériels et méthodes		37
1	Matériel biologique : production des larves pédivéligères	39
2	Observations morphologiques	40
2.1	Microscopie électronique à balayage	40
2.1.1	Préparation des larves.....	40
2.1.2	Visualisation de l'adhésif.....	41
2.2	Histologie.....	41
2.2.1	Coloration hématoxyline - éosine	42
2.2.2	Coloration tetrachrome.....	42
2.2.3	Coloration au nitro-bleu de tétrazolium (NBT)	42
2.2.4	Coloration de Arnow	42
2.3	Microscopie électronique à transmission	43
3	Caractérisation moléculaire	44
3.1	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	44
3.2	Analyses protéomiques	45
3.2.1	Analyse protéomique de l'adhésif sécrété.....	45
3.2.2	Extractions protéiques	45
3.2.3	Analyse directe	46
3.2.4	Protéomique comparative aux stades véligère et pédivéligère.....	48
3.2.5	Protéomique de la glande	49
3.3	Hybridation <i>in situ</i> ARN : localisation de transcrits potentiellement impliqués dans l'adhésion	51
3.3.1	Synthèse des sondes ARN	51
3.3.2	Vérification de la spécificité des sondes : DOT BLOT	51
3.3.3	Hybridation <i>in situ</i> sur coupes.....	52
3.3.4	Hybridation <i>in situ</i> whole mount.....	53
4	Analyses de données transcriptomiques du génome de l'huître <i>C. gigas</i>	54

CHAPITRE III - Sécrétion de l'adhésif par le pied de la larve pédivéligère de <i>Crassostrea gigas</i>	57
1 Introduction.....	59
2 Résultats.....	60
2.1 Le pied, organe actif de l'adhésion de la larve de <i>C. gigas</i>	60
2.2 Morphologie du pied de la larve de <i>C. gigas</i>	62
2.3 Le pied, un réseau complexe de glandes d'adhésifs	64
2.4 L'adhésif sécrété : une matrice protéique fibreuse	69
2.4.1 Structure de l'adhésif	69
2.4.2 Composition moléculaire globale de l'adhésif	71
3 Discussion.....	73
3.1 Morphologie du pied et rôle lors du <i>crawling</i>	73
3.2 Libération de l'adhésif final, composition globale	78
4 Conclusion	80
 CHAPITRE IV - Recherche de gènes impliqués dans la sécrétion et la composition de l'adhésif de <i>Crassostrea gigas</i>	 83
1 Introduction.....	85
2 Résultats : gènes spécifiquement exprimés au stade pédivéligère	87
3 Discussion.....	91
3.1 Séquences hypothétiques	91
3.2 Séquences intervenant dans les mécanismes d'oxydo-réduction	91
3.3 Protéases et Inhibiteurs d'enzymes	94
3.4 Séquences apparentées à la matrice extracellulaire.....	95
3.5 Séquences calcifiantes.....	96
4 Proposition d'un modèle d'interactions moléculaires au sein de l'adhésif de <i>C. gigas</i>	99
5 Conclusion	102
 CHAPITRE V - Etude des protéines intervenant dans l'adhésion de la larve pédivéligère de <i>Crassostrea gigas</i>	 103
1 Introduction.....	105
2 Protéomique ciblée de la glande C de <i>Crassostrea gigas</i>	107
3 Protéomique comparative de larves entières de <i>C. gigas</i>	108
3.1 Protéines potentiellement indirectement impliquées dans l'adhésion.....	110
3.1.1 Protéines de la tâche océlaire	110
3.1.2 Protéines impliquées dans le développement neuronal et la transmission de signaux.....	110

3.1.3	Protéines potentiellement impliquées dans la synthèse et la sécrétion de l'adhésif	111
3.2	Protéines potentiellement impliquées dans la structure des sécrétions adhésives	112
3.2.1	Protéine de type mucine	112
3.2.2	Protéine oxydo-réductrice.....	112
3.2.3	Protéine contenant un domaine lectine de type C	113
3.2.4	Protéine de type collagène.....	113
3.3	Représentations des rôles hypothétiques des protéines détectées	115
4	Protéomique des empreintes d'adhésif de <i>C. gigas</i>	117
4.1	Extractions protéiques	117
4.2	Digestion enzymatique des empreintes et analyse en spectrométrie de masse.....	118
4.2.1	Protéines de traduction et de transcription.....	118
4.2.2	Protéines impliquées dans la biosynthèse des protéines	121
4.2.3	Protéines de structure et du métabolisme énergétique.....	123
4.2.4	Protéine non caractérisée	128
4.3	Localisation par hybridation <i>in situ</i> ARNm de la séquence non caractérisée CGI_10007887 129	
5	Conclusion	133
Chapitre VI - Discussion générale et perspectives		135
1	Homologies morphologiques du pied chez les mollusques bivalves précédemment étudiés et <i>C. gigas</i>	138
2	Natures des différents adhésifs sécrétés par la larve pédivéligère de <i>C. gigas</i>	140
2.1	Adhésif réversible lors du crawling	140
2.2	Adhésif permanent lors de l'adhésion	141
3	Identification de gènes et de protéines intervenant probablement dans l'adhésion de la larve pédivéligère de <i>C. gigas</i>	142
3.1	Adhésion réversible et détection du substrat lors de la phase de <i>crawling</i>	142
3.2	Adhésion permanente, fibres adhésives	143
3.2.1	Méthodes d'analyse complémentaires	143
3.2.2	Implication probable de protéines de type perlucine dans l'adhésion.....	144
3.2.3	Le collagène, protéine structurale de l'adhésif ?	145
4	Groupements chimiques intervenant dans l'adhésion permanente de <i>C. gigas</i>	146
4.1	La DOPA est-elle présente dans l'adhésion de <i>C. gigas</i> au stade pédivéligère ?	146
4.2	Interactions moléculaires probables dans l'adhésif de <i>C. gigas</i>	147
4.3	Relations entre la structure physique de l'adhésif de <i>C. gigas</i> et sa composition moléculaire.....	149

4.3.1	Répartition de l'adhésif lors de la sécrétion.....	149
4.3.2	Deux structures physiques au sein de l'adhésif	150
5	Relations entre adhésif et environnement	151
6	Conclusion	152
	Bibliographie	155
	Annexe 1.....	175

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Méthode de collage utilisée par l'homme de Neandertal.	7
Figure 2 : Réactions moléculaires lors d'une adhésion entre deux substrats et un adhésif	10
Figure 3: Visualisation de grandeurs physiques impliquées dans les processus adhésifs	11
Figure 4 : Exemple de biomimétisme, le velcro.	14
Figure 5: Système adhésif du gecko.	17
Figure 6 : Système d'adhésion chez le rémora.....	18
Figure 7 : Système d'adhésion chez les plantes <i>Drosera sp.</i>	19
Figure 8 : Système d'adhésion chez les araignées	20
Figure 9 : Diversité et gamme de taille d'organismes représentatifs du biofouling	22
Figure 10 : Observation en microscopie à épifluorescence d'un biofilm multispécifique	23
Figure 11 : Visualisation de <i>podia</i> d'échinodermes oursin	26
Figure 12 : Interrelations entre les classes taxonomiques de mollusques	27
Figure 13 : Le byssus chez la moule.....	28
Figure 14 : Biochimie de la DOPA dans l'adhésion.....	29
Figure 15 : Cycle de vie de l'huître <i>Crassostrea gigas</i>	32
Figure 16 : Observation temporelle de l'adhésion d'une larve pédivéligère de <i>C. gigas</i>	61
Figure 17: Observation en MEB d'une larve pédivéligère de <i>C. gigas</i> adhérente.....	62
Figure 18 : Larve pédivéligère de <i>C. gigas</i> prélevée en phase de <i>crawling</i> observée en MEB	63
Figure 19: Coloration HE de coupes histologiques de larves pédivéligères de <i>C. gigas</i>	65
Figure 20 : Coloration tétrachrome de coupes histologiques de larves pédivéligères de <i>C. gigas</i>	67
Figure 21 : Observations en MET du pied de larve pédivéligère de <i>C. gigas</i>	68
Figure 22 : Observations en MEB de l'adhésif sécrété par la larve pédivéligère de <i>C. gigas</i>	70
Figure 23 : Histochimie des empreintes d'adhésif de <i>C. gigas</i>	71
Figure 24 : Spectre EDS de l'adhésif sécrété par la larve pédivéligère de <i>C. gigas</i>	72
Figure 25: Spectre FTIR de l'adhésif sécrété par la larve pédivéligère de <i>C. gigas</i>	73
Figure 26 : Description morphologique du pied des larves pédivéligères de <i>C. gigas</i>	74
Figure 27 : Comportement évolutif du pied de la larve pédivéligère de <i>C. gigas</i> au cours du <i>crawling</i>	77
Figure 28: Domaines conservés et séquences répétées détectés parmi 38 séquences spécifiquement exprimées au stade pédivéligère de <i>C. gigas</i>	91
Figure 29: Alignement de 5 séquences protéiques EKC18891, EKC42164, EKC42165, EKC42166, EKC42167, EKC42168, AIWO4139 par le programme COBALT	98
Figure 30: Représentation schématique des interactions moléculaires hypothétiques intervenant dans l'adhésion de la larve pédivéligère de <i>C. gigas</i> , basée sur la sélection des gènes spécifiquement exprimés au stade pédivéligère.	100
Figure 31 : Alignement entre les séquences protéiques XP_011425751.2 et AAL17974.1 selon le programme Phyre2	114
Figure 32 : Représentation schématique des processus cellulaires du pied et de la tâche oculaire intervenant indirectement dans l'adhésion de la larve pédivéligère de <i>C. gigas</i>	115
Figure 33 : Représentation schématique des processus moléculaires intervenant dans l'adhésion de la larve pédivéligère de <i>C. gigas</i>	116
Figure 34 : Hybridation <i>in situ</i> ARNm de <i>Cg_fmp</i> chez <i>C. gigas</i>	130

Tableau 1 : Protocoles d'extraction protéique testés sur les empreintes d'adhésif de <i>C. gigas</i>	46
Tableau 2 : Homologies des glandes identifiées dans le pied des larves pédivéligères de mollusques bivalves.....	75
Tableau 3 : Gènes spécifiquement exprimés au stade pédivéligère de <i>C. gigas</i>	88
Tableau 4 : Liste de protéines détectées chez des larves pédivéligères de <i>C. gigas</i>	109
Tableau 5 : Tests de tampons d'extraction protéique sur des empreintes d'adhésif de <i>C. gigas</i>	117
Tableau 6 : Liste des protéines impliquées dans les processus de traduction et la transcription, identifiées après digestion tryptique des empreintes d'adhésif de <i>C. gigas</i>	119
Tableau 7 : Liste des protéines impliquées dans la biosynthèse des protéines, identifiées après digestion tryptique des empreintes d'adhésif de <i>C. gigas</i>	121
Tableau 8 : Liste des protéines musculaires et du métabolisme énergétique, identifiées après digestion tryptique des empreintes d'adhésif de <i>C. gigas</i>	124
Tableau 9 : Protéine non caractérisée identifiée après digestion tryptique des empreintes d'adhésif de <i>C. gigas</i>	128

Liste des abréviations

(*angl.*) identifie les abréviations issues d'acronymes anglais.

ACN : acétonitrile	DEPC : pyrocarbonate d'éthyl
ADN : acide désoxyribonucléique	DIG : digoxygénine
ADNc : ADN complémentaire	DOPA : L-3,4-dihydroxyphénylalanine
AP : (<i>angl.</i>) alkaline phosphatase = enzyme phosphatase alcaline	dpf : jour post-fécondation
ARED : allocations de recherche doctorale	DTT : dithiothréitol
ARN : acide ribonucléique	ECHA : (<i>angl.</i>) Agence européenne des produits chimiques
ARNm : ARN messenger	EDS : spectroscopie à dispersion d'énergie de rayon X
ASTM : (<i>angl.</i>) Société américaine pour les essais des matériaux	EDTA : acide éthylènediaminetétra-acétique
BICAM : bicarbonate de triéthylammonium	EGF : (<i>angl.</i>) Epidermal Growth Factor
BLAST : (<i>angl.</i>) Basic Local Alignment Search Tool	EMF : eau de mer filtrée
Ca²⁺ : ion calcium	EU : (<i>angl.</i>) Union Européenne
CHCA : acide α -cyano-4-hydroxycinnamique	FTIR : (<i>angl.</i>) spectroscopie à transformée de Fourier
CMR : Cancérogène, Mutagène, Reprotoxique	g : gramme
CO₂ : dioxyde de carbone	h : heure
CryoSEM : (<i>angl.</i>) microscopie électronique à balayage à froid	HCl : acide chlorydrique
Cu/Rh : Cuivre / Rhodium	HMDS : hexaméthylidisilazane
	hpf : heure post-fécondation

Hz : hertz

INRS : Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles

ISH : (*angl.*) hybridation *in situ*

IR : infra-rouge

kDa : kilo Dalton

kV : kilo volt

KeV : kilo electro volt

L : litre

min : minute

M : mole.L⁻¹

μ : micro

m² : mètre carré

mfp : (*angl.*) mussel foot protein = protéine du pied de la moule

Mg²⁺ : ion magnesium

MgCl₂ : chlorure de magnésium

milliQ : eau ultra pure

mm : millimètre

mosmol : milli osmole

MS : (*angl.*) mass spectrometry = spectrométrie de masse

MEB : microscopie électronique à balayage

N : Newton

NaCl : chlorure de sodium

NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

nanoLC : (*angl.*) nano liquid chromatography = chromatographie liquide à nano débits

NaOH : hydroxyde de sodium

NBT : nitro-bleu de tétrazolium

NCBI : (*angl.*) : National Center for Biotechnology Information

nm : nanomètre

Pa : Pascal

PAS : (*angl.*) Periodic Acid Schiff = acide periodique de Schiff

PBS : (*angl.*) phosphate buffer saline = tampon phosphate salin

PCR : (*angl.*) polymerase chain reaction = amplification en chaîne par polymérase

PFA : paraformaldéhyde

pH : potentiel hydrogène

pI : point isoélectrique

ppm : partie par million

PSMs : (*angl.*) peptide-spectrum match = nombre de spectre identifié pour un peptide donné (en spectrométrie de masse)

PSU : (*angl.*) practical salinity unit = unité de salinité

MET : microscopie électronique en transmission

REACH : règlement européen (n°1907/2006) = enRegistrement, Evaluation et Autorisation des produits CHimiques.

RPKM : (*angl.*) reads per kilobase million = calcul du nombre de lectures par kilobase d'exon par million de lectures alignées

SDS PAGE : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

SiO₂ : dioxyde de silicium

SSC : (*angl.*) sodium sodium citrae = solution saline d'acide citrique

TAE : Tris-acétate EDTA

TFA : acide trifluoroacétique

TOF : (*angl.*) time of flight = temps de vol

UMR : unité mixte de recherche

UV : ultra violet

Avant propos

L'objet de cette thèse est l'étude du phénomène d'adhésion chez la larve d'huître creuse du Pacifique *Crassostrea gigas* au stade pédivéligère.

Le cycle de vie de *C. gigas* comprend une phase larvaire pélagique, suivie d'une phase de vie benthique après la métamorphose. La transition entre ces deux phases s'effectue au stade pédivéligère, suite à une fixation de la larve sur un substrat. Pour se fixer, la larve sécrète un bioadhésif permanent dont la composition n'a jamais été investiguée chez *C. gigas*. Cette étape est cruciale en ostréiculture, permettant le recrutement des larves en milieu naturel pour une mise en élevage future. *C. gigas* est à la première place de la production aquacole mondiale en terme de tonnage.

Les bioadhésifs sont des colles naturelles synthétisées par les organismes vivants, qui présentent des qualités intéressantes. Chez les organismes marins, les bioadhésifs sont efficaces en milieu aqueux, et offrent de vastes propriétés (adhésion réversible, permanente et de forces variées). Ces matrices représentent des alternatives par biomimétisme aux adhésifs synthétiques qui dominent actuellement le marché mondial. Le développement d'adhésifs biomimétiques implique d'abord d'avoir décrit les concepts d'adhésion utilisés par les organismes vivants, par la recherche fondamentale. Ceci passe dans un premier temps par l'observation et la description de la structure des bioadhésifs et des organes qui les produisent et les sécrètent, afin d'identifier les mécanismes mis en jeu dans l'initiation et le maintien de l'adhésion. Ensuite, les molécules composant l'adhésif doivent être identifiées, afin de comprendre les mécanismes moléculaires intervenant dans l'adhésion. Enfin, une valorisation biotechnologique peut être envisagée, comme le développement et la formulation d'adhésifs innovants.

Bien que l'organe adhésif des larves pédivéligères de bivalves ait été décrit chez des espèces proches de *C. gigas*, des questions demeurent quant à la présence de structures cellulaires comparables chez *C. gigas*. L'évaluation morphologique du système adhésif de la larve pédivéligère de *C. gigas* doit donc être réalisée en détail. Pour ce faire, les techniques d'histologie et d'imagerie en microscopie peuvent fournir une image du système adhésif, qui dans un second temps seront corrélées avec la localisation de molécules d'intérêt.

La plupart des bioadhésifs marins animaux sont de nature protéique mais ce point devait être confirmé et complété chez *C. gigas* par un profilage moléculaire de l'adhésif. Une première approche générale

par spectroscopie a été utilisée pour définir la nature moléculaire globale de l'adhésif. Elle a été complétée par la recherche des gènes impliqués dans l'adhésion dont l'identification a apporté des informations sur les voies de biosynthèse de l'adhésif, sur sa composition et sur les enzymes potentiellement impliquées dans l'initiation des liaisons chimiques. L'analyse et la synthèse des informations obtenues a permis d'élaborer des hypothèses concernant le bioadhésif de *C. gigas*.

Enfin, après avoir développé des procédures d'extraction et d'analyses protéiques, l'identification des protéines adhésives réalisée chez *C. gigas*, a permis de valider en partie les hypothèses formulées précédemment. Cependant cette démarche scientifique s'est heurtée à un frein majeur systématiquement rencontré lors de l'étude des organismes au stade larvaire, à savoir, la faible quantité de bioadhésif disponible. Le modèle biologique choisi qui est *C. gigas* présente toutefois des avantages. Son cycle de vie est très bien maîtrisé en éclosérie ce qui permet d'obtenir des larves en quantité importante, homogènes en terme de stade de développement. De plus, le génome de *C. gigas*, publié en 2012, apporte un soutien aux analyses protéomiques. Ces connaissances ont été un levier majeur pour répondre aux questions scientifiques posées par l'étude de ce bioadhésif.

Les résultats de ces travaux de thèse permettent d'apporter des connaissances nouvelles dans l'étude des bioadhésifs de larves pédivéligères chez les mollusques bivalves. Les hypothèses formulées à partir de ces résultats ont permis de proposer un schéma conceptuel de l'adhésion de la larve pédivéligère de *C. gigas*. *In fine*, les connaissances acquises par ces travaux pourraient initier le développement de stratégies de recrutement de larves d'huître plus efficaces en milieu naturel pour l'ostréiculture. Le développement de nouveaux adhésifs pourrait également être envisagé.

Le salaire de cette thèse a été financé par l'Université de Bretagne Occidentale (U.B.O.) (50%) et par la Région Bretagne (bourse ARED 50%). Ce travail a été réalisé sous la direction scientifique du Professeure Claire Hellio et la co-direction scientifique du Professeure Fabienne Guérard et du Docteur Pierre Boudry au sein du Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (UMR 6539) et de l'Institut Universitaire Européen de la Mer de l'U.B.O. L'obtention de trois « projets blancs » de l'IUEM en 2016, 2017 et 2018 a contribué à la réalisation des analyses et à la publication des résultats dans le journal *Nature Scientific Report* en « *Open access* ». La présentation des résultats obtenus au cours de cette thèse a également été financée par le Laboratoire d'Excellence LabexMER (ANR-10-LABEX-19).

Liste des publications et communications scientifiques

Publications :

Acceptée :

Foulon, V., Artigaud, S., Buscaglia, M., Bernay, B., Fabioux, C., Petton, B., Elies, P., Boukerma, K., Hellio, C., Guérard, F., Boudry, P. (2018). Proteinaceous secretion of bioadhesive produced during crawling and settlement of *Crassostrea gigas* larvae. *Sci. Rep.* 8, 15298.

En préparation :

Foulon, V., Artigaud, S., Hellio, C., Boudry, P., Guérard, F. (soumission prévue 01/2019). *In silico* analysis of *Crassostrea gigas* genome highlight candidate genes for settlement.

Foulon, V., Réhel, K., Guérard, F., Boudry, P., Hellio, C. (soumission prévue 01/2019). Stick to stay in the light: algal bioadhesives, a review. *Philosophical Transactions B – special issue*.

Communications orales:

Foulon Valentin, Boudry P., Guérard F., Hellio C. (2018) **To stick underwater? Ask to oyster larvae!** 1^{ère} Journées de l'EDSML (Ecole Doctorale des Sciences de la Mer et du Littoral). 13-14 Février 2018. Brest – France.

Foulon Valentin, Petton B., Artigaud S., Buscaglia M., Guérard F., Hellio C., Boudry P. (2017). **First insights into the composition of adhesive secreted by *Crassostrea gigas* larvae during settlement.** 9^{ème} "Rendez-Vous de Concarneau: Where Industry meets Science in marine Biotechnology". 25-26 Septembre 2017. Concarneau – France.

Foulon V., Petton B., Artigaud S., Buscaglia M., Guérard F., Hellio C., Boudry Pierre (2017). **First insights into the composition of adhesive secreted by *Crassostrea gigas* larvae during settlement.** Congrès international Physiomar. 18-21 Septembre 2017. Cambridge – Angleterre.

Foulon V., Petton B., Artigaud S., Buscaglia M., Guérard F., Hellio C., Boudry Pierre (2017). **First insights into the composition of adhesive secreted by *Crassostrea gigas* larvae during settlement.** 7th International Oyster Symposium "Sustainable expansion of global oyster production." 11-14 September 2017, Bangor – Wales.

Foulon Valentin, Boudry P., Guérard F., Hellio C. (2017). **From *Crassostrea gigas* oyster larvae adhesion studies to potential biotechnological development of marine adhesives.** 40th Annual meeting of the Adhesion Society. 26 Février - 1 Mars 2017. St Petersburg – Floride.

CHAPITRE I

Introduction générale

1 Colles et adhésifs, définitions

La définition du dictionnaire Larousse du terme « adhésif » est la suivante : « Substance capable d'assembler deux surfaces en contact par création de liaisons superficielles durables ». Le terme « colle » bénéficie d'une définition proche : « Substance ou préparation capable de maintenir ensemble, par adhérence durable, des matériaux en contact ». L'étymologie de « colle » provient du grec *kolla* (κ ὀ λ λ α), qui signifie gomme, colle.

1.1 Historique et production mondiale des adhésifs

Le collage serait un des premiers processus artisanaux inventés par l'homme (Mazza *et al.*, 2006), dont les premières traces ont été observées sur des emmanchements d'outils datant de 120 000 ans. Il est probable que l'Homme de Néandertal, à partir d'écorce de bouleau, ait été capable de fabriquer de la colle il y a 200 000 ans (Kozowyk *et al.*, 2017). Le mélange utilisé était probablement proche du goudron, basé sur l'extraction des composés résineux végétaux placés à couvert et chauffés rapidement (Figure 1).

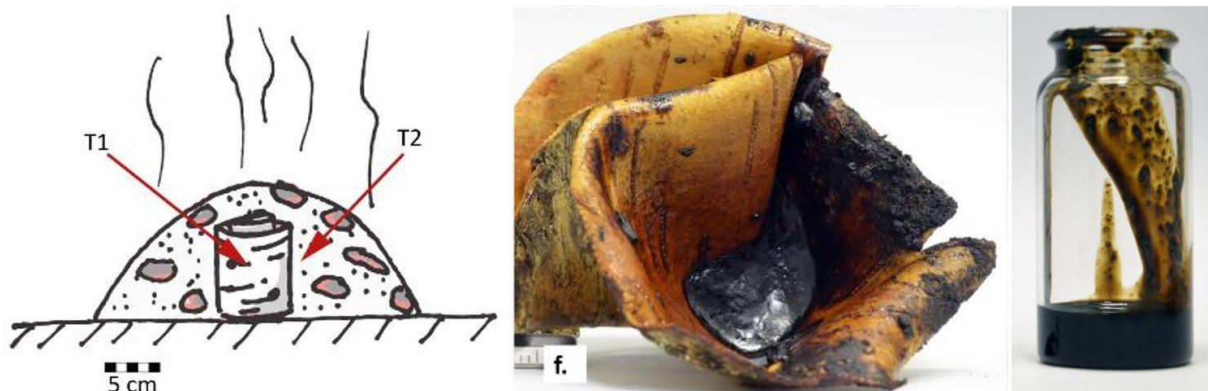


Figure 1 : Méthode expérimentale, probablement utilisée par l'homme de Néandertal, permettant d'obtenir à partir de l'écorce de bouleau placée à température élevée et à couvert (à gauche) un goudron végétal (au milieu et à droite). Adapté de Kozowyk *et al.* (2017).

Les goudrons végétaux, notamment résineux, ont été ensuite largement employés pour leur résistance à l'eau. Ils permirent notamment d'étanchéifier les navires en bois (calfatage) jusqu'au début du XX^{ème} siècle (Baillly, 2015). D'autres colles végétales (résines, gommés, latex) ont été utilisées au cours de l'histoire pour fabriquer des peintures d'ornement, créer des parures, des reliures de livres, étiqueter, etc. Les colles à base de farine, utilisant les propriétés collantes de l'amidon après mélange à l'eau ont également été largement utilisées, et représentent encore aujourd'hui une source de colle bon marché, non toxique et biodégradable en pleine expansion (Gadhavé *et al.*, 2017; Schwartz and Whistler, 2009).

Les colles d'origine animale, basées principalement sur l'extraction protéique, ont également été utilisées au cours de l'histoire (Pizzi and Mittal, 2017). Les gélatines et collagènes, extraits à chaud des tissus animaux, ont servi à coller dès l'antiquité. Cette méthode de collage est en effet rapportée dans des écrits de l'Égypte ancienne datés de 3300 ans (Hull and Bangert, 1952). Au Moyen Âge, l'utilisation de blanc d'œuf et de miel comme liant dans les enluminures a été rapportée. La colle dite « de poisson », également basée sur le collagène présent dans les tissus biologiques a longtemps été une colle universelle, toujours utilisée pour le collage en ébénisterie (Lambuth, 2017). Les colles « naturelles » d'origine végétales ou animales ont laissé place aux colles dites synthétiques mais sont encore utilisées, présentant généralement une absence de toxicité, un faible coût (valorisation de co-produits) et des propriétés adhésives adaptées à leurs usages.

C'est au début du XX^{ème} siècle, de manière concomitante au développement de la pétrochimie et de la plasturgie, que les premières colles synthétiques ont été mises au point. L'histoire du caoutchouc, matière naturelle végétale collante issue du latex de certains végétaux, utilisé en Amérique du Sud depuis des siècles témoigne de cette évolution. En 1907, le chimiste Fritz Hofmann réussit à synthétiser un caoutchouc issu d'hydrocarbures. Huit ans après cette découverte, l'Allemagne produisait 2500 tonnes de ce nouveau matériau dont la demande ne cessa de croître avec l'essor de l'industrie automobile et aéronautique (Barker, 1940; Harp, 2015). Ces industries sont demandeuses d'adhésifs performants, permettant d'accélérer et de faciliter les assemblages sur les chaînes de production. La croissance exponentielle de la production de plastique au début du XX^{ème} siècle reflète un changement de mode de vie dans les pays développés, amenant à l'utilisation de produits à usage unique, et à la diversification des objets présents dans le quotidien (Plastic Europe, 2015). L'assemblage des objets en matière plastique nécessite des adhésifs efficaces, manufacturables en grande quantité et de faible coût. La production d'adhésif va donc suivre la croissance exponentielle de la production de matière plastique. Ainsi, la production mondiale de matières adhésives représente aujourd'hui environ 20 millions de tonnes, pour un marché mondial d'environ 50 milliards de dollars, avec une croissance annuelle d'environ 4% (Coatings World Magazine). Parallèlement à cette production croissante, une diversification de l'offre d'adhésifs disponibles est observée, permettant de répondre à la multiplication des usages et des demandes. Cette diversification concerne également les colles non synthétiques, qui occupent une part minoritaire mais croissante du marché mondial.

1.2 Paramètres définissant un adhésif

Un adhésif présente des propriétés lui permettant de répondre à un usage donné. Il y donc en théorie autant d'adhésifs nécessaires que de situations de collage. Les propriétés d'une colle diffèrent selon les usages, par exemple un Post-it[®], un tissu humain, ou une aile d'avion présentent chacun des

contraintes propres. L'adhésion est donc un domaine de recherche très vaste et varié. L'adhésion ne concerne pas uniquement l'assemblage de deux objets, mais peut également être évoquée dans la structure de certains matériaux composites, formés d'une résine (époxy, polyester) qui adhère à ses fibres (carbone, verre, naturelles). L'adhésion intervient également dans les revêtements (enduits, peintures). Au niveau moléculaire, l'ensemble de ces produits sont constitués de polymères présentant des structures chimiques permettant d'adhérer à la surface d'application.

Un principe général peut être évoqué en ce qui concerne l'adhésion. L'élément crucial permettant de réaliser une adhésion est de provoquer un contact intime entre deux surfaces (Pastewka and Robbins, 2014). La surface peut être d'origine organique (bois, tissus, papier, plastique) ou minérale (verre, pierres, métaux). Une surface, d'un point de vue chimique, est la couche de molécules qui est responsable de l'interaction initiale entre deux substances. De manière simple, si l'on place sa main contre une vitre, et que l'on effectue une action dans le sens perpendiculaire et parallèle à la vitre, une résistance apparaît : notre main adhère au verre. Dans ce modèle, deux surfaces peuvent être étudiées : la couche de molécules de SiO_2 de la vitre et la couche de molécules organiques à la surface de la main. L'adhésion résulte d'une force d'attraction entre deux matériaux, dans ce cas: la main et la vitre. Elle peut être directe, c'est-à-dire qu'une relation s'établit entre les surfaces des 2 matériaux mis en contact. C'est le cas des paillettes de mica que l'on retrouve sur les plages, composées de feuillets adhérent entre eux par contact direct (Wan *et al.*, 1992). Ce type d'adhésion est plutôt rare. L'adhésion indirecte est plus généralement observée, faisant intervenir entre les 2 surfaces un troisième partenaire : un adhésif ou colle. Cela reprend donc la définition générale d'un adhésif, qui est une substance capable d'assembler deux surfaces en contact par création de liaisons superficielles durables (Encyclopédie Larousse).

Le phénomène d'adhésion résulte d'interactions à différents niveaux d'échelles, de l'atome, aux structures macroscopiques (de l'ordre du mm) définissant la rugosité du substrat. La Figure 2 présente les différents niveaux d'interactions potentielles intervenant dans une adhésion. Au niveau atomique, les interactions de Van der Waals, les interactions ioniques, et les liaisons hydrogènes sont responsables de liaisons de faible énergie. Lorsque des groupements chimiques sont disponibles, les liaisons covalentes peuvent s'établir et engendrer une adhésion plus forte. La polymérisation, qui définit les réactions chimiques impliquées dans la formation de macromolécules (polymères) à partir de molécules de plus faible poids moléculaire, intervient également dans la plupart des adhésifs synthétiques.

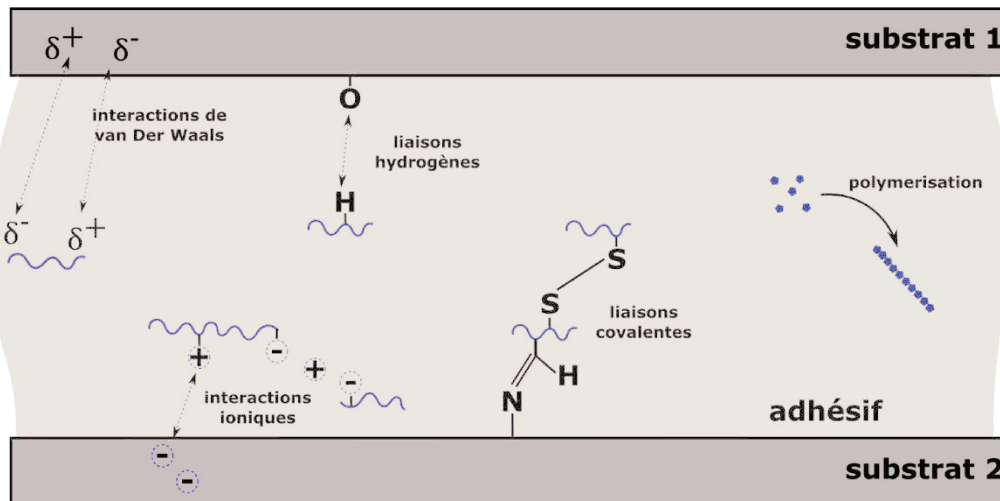


Figure 2 : Réactions moléculaires potentielles lors d'une adhésion entre deux substrats et un adhésif.

La mise en œuvre de l'adhésion va dépendre des natures du substrat et de l'adhésif, définies par leurs propriétés physiques telles que la tension de surface de l'adhésif, la mouillabilité du substrat, et sa rugosité (Figure 3). La tension de surface définit les forces appliquées sur les molécules présentes en surface d'un fluide, résultantes de l'ensemble des interactions physico-chimiques s'appliquant sur celles-ci. Dans le cas de l'interface entre l'eau et de l'air, la tension de surface permet à certains insectes de marcher sur l'eau (Figure 3A). La mouillabilité d'un substrat est une mesure définissant l'étalement d'un fluide sur celui-ci. Un substrat fortement hydrophobe, comme la feuille de lotus, présente une très faible mouillabilité pour l'eau, qui forme alors des gouttes à son contact (Figure 3B). Enfin, la rugosité du substrat définit la présence d'aspérités sur celui-ci. Cet état de surface va influencer l'étalement d'un adhésif (Figure 3C), et va également rendre possible ou non des interactions moléculaires entre deux surfaces. L'exemple des lames de microscopie collées entre elles est un exemple d'adhésion entre deux surfaces très lisses. Les forces d'adhésion, et la nature des interactions moléculaire va permettre de définir si l'adhésion est de type irréversible ou réversible. Une adhésion réversible va pouvoir être rompue et ré-initiée à de multiples reprises (exemple du Post-it®), contrairement à l'adhésion irréversible qui une fois rompue n'est plus fonctionnelle (Pisanova and Zhandarov, 2001).

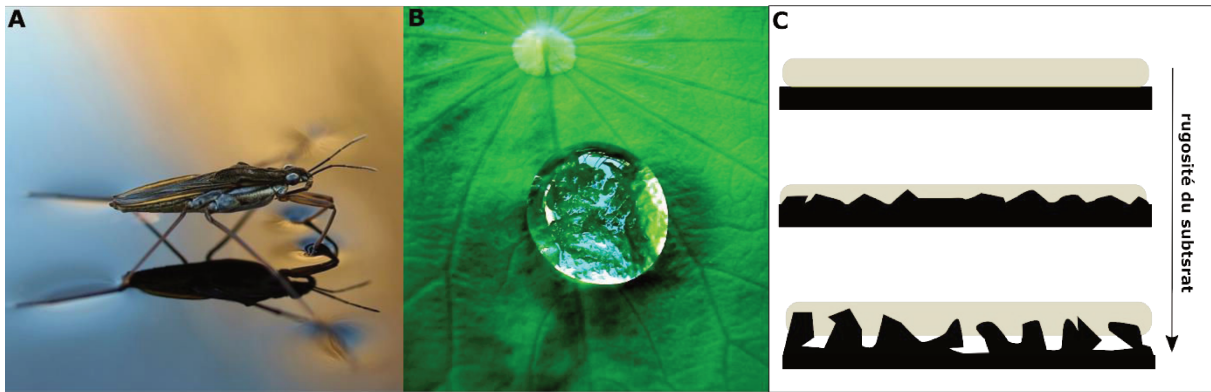


Figure 3 : Visualisation de grandeurs physiques impliquées dans les processus adhésifs : A) Tension de surface de l'eau : permettant à un insecte de se déplacer à la surface, B) Mouillabilité : la feuille de lotus présente une très faible mouillabilité, l'eau forme une goutte sphérique à sa surface, C) Rugosité : représentation schématique de substrats à rugosité croissante (noir) et de l'imprégnation de ceux-ci par un adhésif (jaune). Photos : Flickr, license CC.

Les traitements de surface préalablement réalisés dans la plupart des collages industriels visent à optimiser l'état de surface des pièces à assembler, afin de rendre l'adhésion efficace (Pizzi and Mittal, 2017). La robustesse de l'adhésion va ensuite dépendre de la capacité de l'interface à absorber et dissiper l'énergie susceptible de séparer les deux surfaces mises en contact. La mesure des forces d'adhésion se fait par des protocoles standardisés par ASTM international, permettant de déterminer les limites de rupture des matériaux et des adhésifs. Cette mesure est exprimée en unité de force par surface ($N/m^2 = Pa$) (ASTM International). L'ensemble de ces mesures, en plus des propriétés spécifiques (viscosité, temps d'action, durée de vie, couleur, odeur, toxicité, biocompatibilité) permettent de définir si un adhésif répond ou non aux critères d'application. La diversification des besoins en adhésifs a motivé la recherche pour la découverte de molécules aux propriétés adhésives spécifiques.

1.3 Les colles synthétiques

La majorité de la production mondiale d'adhésifs est constituée de colles synthétiques issues de la pétrochimie. Ces adhésifs peuvent être répartis en différentes catégories, de par leur composition. Les colles époxydes, polyuréthanes, acryliques, et à base de solvant sont parmi les colles synthétiques les plus produites au monde.

1.3.1 Les colles époxydes

Les colles époxydes, couramment appelées « epoxy » se composent d'une résine et d'un durcisseur. C'est un adhésif thermodurcissable, formé d'un polymère tridimensionnel d'époxydes après réticulation. Les résines epoxy sont largement utilisées dans l'industrie aérospatiale, nautique, dans la construction, ainsi que dans la plupart des matériaux composites. Ce type de colle présente une excellente résistance à la température, une durée de vie longue, mais un coût généralement élevé. La

toxicité de l'époxy peut provenir du monomère ou du durcisseur. Le monomère époxy est généralement synthétisé à partir de bisphénol A ou d'épichlorohydrine identifiés comme substance CMR (cancérogène, mutagène et reprotoxique) (Kang *et al.*, 2006). Les résines phénoliques et époxy sont classées par l'agence européenne des produits chimiques (ECHA) comme dangereuses pour l'environnement et pour la santé. L'exposition répétée aux colles époxy est également reconnue comme facteur de déclenchement d'irritations cutanées (Institut National de Recherche et de Sécurité - INRS). Récemment, des colles epoxy dites « green » ou « bio » ont été mises sur le marché : elles comportent un pourcentage de carbone végétal, diminuant ainsi l'impact carbone de ces produits, mais leur toxicité n'est néanmoins pas diminuée (Aouf *et al.*, 2012; Xin *et al.*, 2014).

1.3.2 Les colles polyuréthanes

Les colles polyuréthanes sont généralement dites bi-composantes (plutôt destinées à un usage industriel), mais peuvent également être mono-composantes (usage domestique). Cette dénomination indique la présence ou non d'un agent durcisseur conférant une résistance accrue. La colle polyuréthane mono-composante polymérise avec l'humidité de l'air, tandis que le bi-composant polymérise grâce à un durcisseur, portant un groupement alcool. Les colles polyuréthanes regroupent une quantité importante de formulations, adaptées à des applications diverses. Les polyuréthanes sont majoritairement utilisés dans la confection de structures mousseuses telles que les plaques isolantes. Ces colles sont largement utilisées dans l'industrie, le bâtiment, pour le collage des métaux, du verre, et des bétons. Elles présentent généralement une très grande durée de vie, une résistance à l'eau et une certaine souplesse. La majorité des études sur la toxicité des colles polyuréthanes porte sur les émissions de cyanure d'hydrogène lors de sa combustion (Landry *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018). Les fiches de données sécurité de la plupart des colles polyuréthanes présentent une classification CMR et dangereux pour la santé.

1.3.3 Les colles acryliques

L'une des colles acryliques la plus connue est certainement la cyanoacrylate, couramment appelée « SuperGlue » du fait de son succès commercial. Cette colle forte à tout faire est commercialisée par l'entreprise Loctite depuis les années 1970. Ses principaux avantages sont sa rapidité de polymérisation, généralement inférieure à la minute, et sa résistance. Les cyanoacrylates sont majoritairement utilisés pour des applications précises, telles que l'électronique, la mécanique de précision, les soins dentaires, et la chirurgie. Malgré leur toxicité identifiée par la convention REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals - règlement n°1907/2006), les cyanoacrylates chirurgicaux permettent le collage de certaines plaies ou implants (Ferreira *et al.*, 2013; Leggat *et al.*, 2004), apportant ainsi un bénéfice pour le patient. Certaines colles acryliques dites anaérobies

polymérisent uniquement en absence d'oxygène, et peuvent être activées par UV, ondes électromagnétiques, ou solvants.

1.3.4 Les colles à base de solvant

Les colles à base de solvant sont constituées de molécules aux propriétés collantes maintenues en phase liquide par un solvant (formaldéhyde, éther, acétone, hexane, toluène...). La colle néoprène en est un exemple. Le solvant s'évapore au cours de la polymérisation, laissant l'adhésif en place, et permettant l'adhésion. La plupart des colles utilisées dans l'industrie du bois sont des adhésifs à base d'urée et de formaldéhyde. L'inconvénient majeur des colles à base de solvant est leur toxicité, elles sont un des contributeurs majeurs de l'émission de composés organiques volatiles au niveau mondial (McDonald *et al.*, 2018). Cependant, leur efficacité et leur faible coût de production à l'échelle industrielle continue de les rendre très compétitives. Les colles dites aqueuses sont des adhésifs dont le solvant est l'eau. Elles présentent de nombreux avantages économiques et permettent l'utilisation de colles dans des domaines où les solvants toxiques sont interdits. Cependant, les colles à base d'eau ne sont pas toutes exemptes de toxicité, qui peut provenir de l'agent collant ou des additifs.

Depuis quelques années, le marché des adhésifs est en mutation. Face à la pollution plastique mondiale massive, aux enjeux environnementaux, et aux enjeux sociétaux, de nouvelles lois restreignent l'utilisation d'adhésifs toxiques pour certaines applications (Kim, 2010). En Europe, la convention REACH, encadre ainsi l'utilisation des substances chimiques dont certaines concernent les adhésifs. Par exemple, l'annexe XVII précise une limite de toluène (inflammable, toxique, CMR) à 0,1% du poids total d'un adhésif. Dans le domaine de la construction, des normes d'émission de particules pendant et après usage des matériaux s'appliquent également aux adhésifs (Directive Decopaint 2004/42/EC, Règlement EU n°10/2011, Règlement EU n° 305/2011, Grenelle de l'environnement). Ces nouveaux règlements et les enjeux environnementaux mondiaux motivent la recherche de solutions innovantes dans ce domaine et la mise au point de nouvelles méthodes de collage, plus respectueuses de l'environnement. Certaines applications sont également en manque de solutions efficaces de collage, qui pourraient être inspirées par la découverte de nouveaux adhésifs naturels.

1.4 Développement de colles naturelles

1.4.1 Le biomimétisme

Le développement de « colles naturelles » se fait selon le concept de biomimétisme. Ce terme désigne l'action de s'inspirer de la nature pour répondre à un problème donné. Le biomimétisme est possible grâce à la connaissance acquise par la recherche fondamentale, sur les modes de fonctionnement des organismes vivants dans le milieu naturel. Généralement, une démarche biomimétique permet une

diminution des coûts et de moindres impacts environnementaux. Ceci explique que cette stratégie soit de plus en plus étudiée et utilisée, en parallèle des actions de développement durable. Un exemple d'innovation par biomimétisme est le velcro, breveté en 1955 (De Mestral, 1955), qui mime l'adhésion mécanique observée chez les graines de certaines plantes (*Arctium* notamment) par des crochets présents à leur surface (Figure 4).

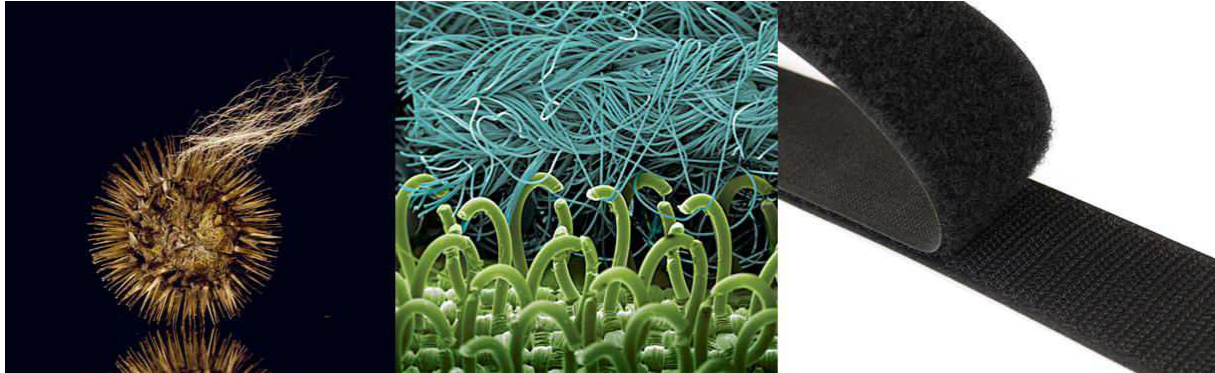


Figure 4 : Exemple de biomimétisme, le velcro. L'étude de la graine de chardon (à gauche) qui s'accroche au pelage des animaux pour se disperser a permis de créer des matrices en matière synthétique mimant les crochets de la graine (au milieu en vert) et les poils d'animaux (au milieu en bleu). La bande de velcro (à droite) est largement utilisée dans l'industrie textile. Photos : Robert Clark et Emily T. Griffiths, American Museum of Natural History.

Après l'essor des colles de synthèse au XX^{ème}, la recherche se (re)-concentre sur les colles bio-sourcées, ou biomimétiques. Ainsi, les progrès dans les domaines de la chimie, de la physique, de la biologie et des biotechnologies, permettent de s'inspirer des colles naturellement produites par certains organismes vivants pour produire des colles biomimétiques (Bhushan, 2009). La diversité et la complexité des processus d'adhésion mis en œuvre par les organismes vivants empêchent pour l'instant la reproduction à l'identique de ces colles. Les adhésifs présents dans la nature sont généralement appelés « bioadhésifs ». Un bioadhésif peut être considéré comme une substance collante biocompatible. C'est-à-dire utilisable dans le domaine médical, pouvant servir à assembler des tissus sans présenter de toxicité. Une définition plus large, indique que les bioadhésifs sont des substances collantes produites par des organismes vivants. C'est sous cet angle que les bioadhésifs seront traités dans cette thèse.

Deux axes de recherche concernant les adhésifs biomimétiques peuvent être évoqués :

- 1) Identifier, décrire, et comprendre les stratégies d'adhésion employées par les organismes vivants,
- 2) Utiliser, mimer, et formuler de nouveaux adhésifs basés sur les propriétés d'adhésion précédemment décrites.

La diversité des méthodes d'adhésion présentes dans la nature rend ce type d'études complexes et longues. Ainsi, seulement quelques adhésifs ont été presque entièrement caractérisés à ce jour. Mais il est intéressant de noter que ces études ont permis l'apparition de colles innovantes, s'inspirant des stratégies mécaniques et chimiques observées dans la nature pour améliorer et/ou diversifier l'usage des colles.

1.4.2 Exemples de bioadhésifs biomimétiques

L'étude de l'adhésion du gecko (Figure 5), a permis d'imaginer de nouveaux concepts adhésifs dans le domaine des matériaux (Geim *et al.*, 2003; King *et al.*, 2014; Peressadko and Gorb, 2004) tel que GeckSkin™ (Bartlett *et al.*, 2012; King *et al.*, 2014) ou médical tel que Gecko® Nanoplast® (Dr. Gorb, Binder GmbH Germany). L'utilisation de plusieurs stratégies décrites chez différents organismes est aussi possible, comme le bioadhésif Geckel® qui combine les propriétés structurelles des pattes de gecko et les propriétés chimiques des protéines adhésives présentes dans le byssus de moule (Lee *et al.*, 2007).

L'un des premiers adhésifs tissulaires basé sur les protéines adhésives du byssus de moule fut le Cell-Tak® (Waite, 1987). Depuis, les formulations se diversifient. L'entreprise française Gecko Biomedical utilise les stratégies adhésives de la moule et d'un polychète marin pour formuler un bioadhésif utilisable lors des actes chirurgicaux vasculaires. Pour des applications similaires, les intérêts du mucus sécrété par une espèce de limace *Arion subfuscus* ont été démontrés (Li *et al.*, 2017).

Pour la plupart des études, le point d'entrée sur le marché des colles biomimétiques est aujourd'hui en lien avec le domaine biomédical (Park *et al.*, 2017). Certains bioadhésifs présentent pourtant des propriétés adhésives dépassant les colles synthétiques (North *et al.*, 2017), ou des caractéristiques qui pourraient les rendre intéressantes pour la construction (Burkett *et al.*, 2010; Metzler *et al.*, 2016). Mais ces colles demeurent coûteuses à produire et difficiles à industrialiser. L'augmentation des parts de marché prévue pour les bioadhésifs dans les prochaines années indique pourtant que la recherche progresse, et que ces nouvelles stratégies seront probablement bientôt bien plus largement utilisées (Coatings World Magazine). Leur absence de toxicité, de réactions exothermiques lors de la polymérisation, leur faible réactivité à d'autres substances chimiques, ainsi que leur large panel de viscosité, d'efficacité et de forces, garantissent aux bioadhésifs des attraits certains.

2 Stratégies d'adhésion, et organismes modèles

L'adhésion s'observe dans le milieu naturel chez de nombreux organismes et concerne l'ensemble des règnes taxonomiques (*Archaea, Bacteria, Protozoa, Plantae, Fungi, Animalia*). Elle peut s'observer à

différents niveaux, de la cellule à l'organe spécialisé dans cette action. Actuellement, environ une cinquantaine d'organismes (marins et terrestres) ont été étudiés pour leurs capacités adhésives (Hennebert *et al.*, 2014a; Smith and Callow, 2006; Von Byern and Grunwald, 2010). L'adhésion peut être mécanique, chimique, réversible ou irréversible.

L'adhésion réversible implique l'utilisation d'un adhésif non permanent, ou de faible liaison. L'adhésion temporaire peut donc être rompue « volontairement », par simple détachement de l'organe adhérent par contraction musculaire, ou par sécrétion de molécules « anti-adhésives » qui vont rompre les liaisons chimiques établies. Ce type d'adhésif est utilisé majoritairement dans les actions liées à la locomotion. Cette adhésion peut être mécanique ou chimique.

Au contraire, l'adhésion irréversible fait intervenir un adhésif permanent, généralement de forte liaison, permettant à l'organisme de se fixer durablement au substrat, généralement pour un stade défini, ou sa vie entière. Cette adhésion est généralement chimique, faisant intervenir la libération de l'adhésif par différents mécanismes cellulaires (sécrétion vésiculaire, pores, canaux, glandes spécifiques, cellules caliciformes). La composition des adhésifs chimiques est extrêmement variée selon les organismes (polysaccharides, protéines, lipides, composés secondaires...).

2.1 Exemples d'adhésion mécanique et réversible : le gecko, le poulpe et le rémora

L'adhésion mécanique ne fait pas intervenir d'adhésif, elle est médiée par la rugosité de surface et résulte d'un contact intime entre l'organe adhésif et la surface permettant l'établissement de liaisons de van Der Waals.

2.1.1 Adhésion chez le gecko

L'exemple terrestre le plus étudié est l'adhésion de reptiles arboricoles, capables de se déplacer sur la plupart des surfaces, en position verticale, jusqu'en devers à 90°. Ces reptiles sont couramment appelés geckos, et appartiennent à la famille des *Gekkonidae* et des *Dactyloidae*. Ils possèdent au niveau de leurs doigts des structures très spécifiques, observées pour la première fois en microscopie en 1973 (Miller, 1973). Ces structures s'apparentent à des rangées de poils très fins se ramifiant à leur extrémité pour atteindre un diamètre d'une centaine de nanomètres (Figure 5) (Autumn *et al.*, 2006). Ces structures composées majoritairement de kératine sont des seta, qui permettent, par leur finesse de pénétrer dans toutes les aspérités du substrat, et d'initier une multitude de liaisons de faible énergie entre le doigt et le substrat, dont la somme génère ainsi une force globale très importante. Cette adhésion est réversible et peut être « activée et désactivée » à chaque pas de l'animal. Une patte de gecko d'une surface de 100mm² peut générer une force d'adhésion de 10 Newtons (Autumn *et al.*, 2000), et une seta unique peut générer une force de 194 µN. Récemment, la présence de lipides

associés à la kératine des seta, jouant un rôle dans l'adhésion, a été mise en évidence (Jain *et al.*, 2015). Cette découverte indique que les mécanismes d'adhésion chez cet organisme ne sont pas encore totalement décryptés.

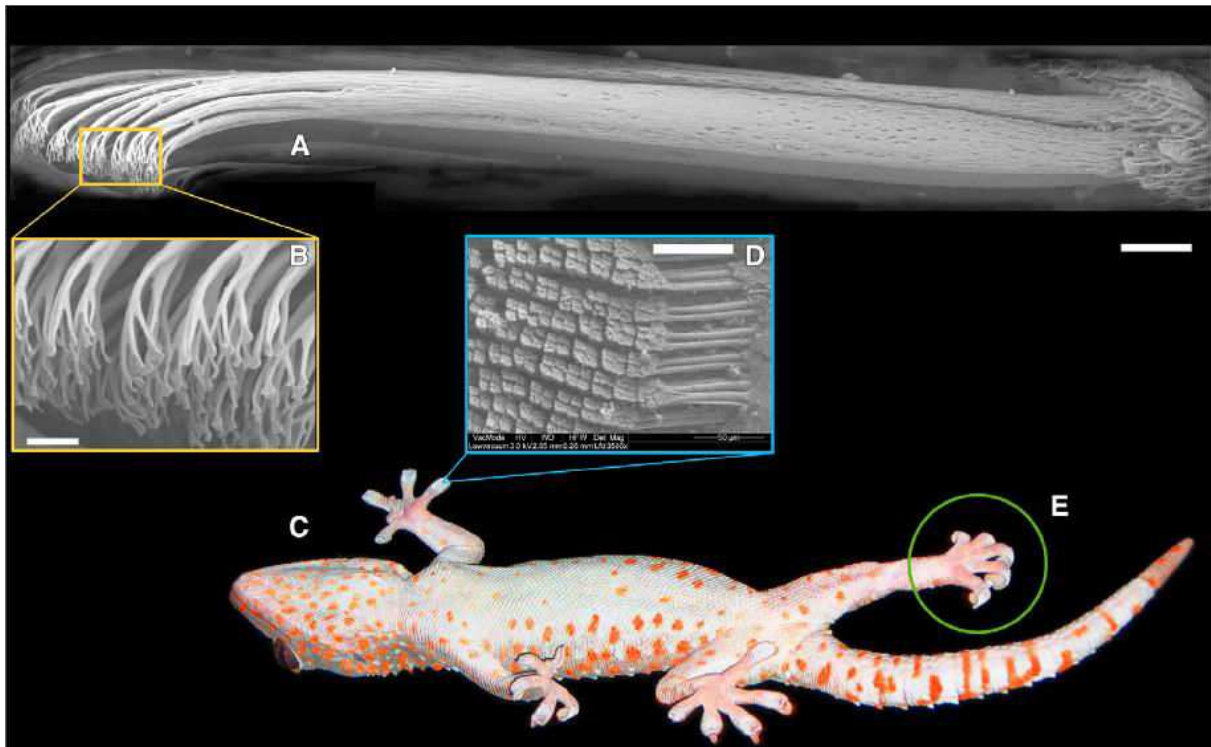


Figure 5 : Système adhésif du gecko. (A) Photographie d'une seta de gecko, assemblée à partir de 5 images réalisées en cryo-SEM (image par S. Gorbard & K. Autumn). (B) Réseau à l'échelle nanométrique de quelques pointes spatulaires d'une seta de gecko. Notez que la surface des spatules forme un plan à un angle aigu par rapport à la base de la seta. Un décollement est provoqué lorsque la seta est relevée au-dessus de 30° (Autumn *et al.* (2000); Gao *et al.* (2005)). (C) Vue ventrale d'un gecko tokay (*Gekko gecko*) grim pant sur une surface vitrée. (D) Les groupes de seta sont disposés sur la face ventrale selon un motif quadrillé. Sur cette image en microscopie électronique à balayage, chaque structure en forme de losange est l'extrémité d'un groupe de 4 seta regroupées en tétrade. (E) Peeling des orteils (hyper extension des doigts lors du détachement). Barres d'échelles, 50µm (D), 5µm (A), 1µm (B). Adapté d'Autumn *et al.* (2006).

La présence de structures similaires, permettant l'établissement de forces de Van der Waals, est également observée sur les pattes de la plupart des arthropodes (Federle *et al.*, 2002). Ces organismes sont également souvent équipés de crochets, permettant d'assurer leur prise sur des substrats rugueux.

2.1.2 Adhésion chez le poulpe

Les céphalopodes sont une autre classe d'organismes pratiquant l'adhésion mécanique réversible. Leurs tentacules sont recouverts de ventouses, capables de succion (Wilker, 2017). Cette succion est possible par l'intervention d'un réseau musculaire complexe autour de la ventouse permettant de former, étendre et contracter la ventouse. Pour adhérer, la ventouse est mise en contact avec le substrat, par la suite, une cavité au centre de celle-ci est créée provoquant une pression négative,

permettant une forte adhésion (Smith, 1991). Cette adhésion fait également intervenir la tension de surface de l'eau, nécessaire au maintien de la cavitation (Kier and Smith, 2002). La pression peut ensuite être relâchée par mécanisme inverse. Cette action permet aux céphalopodes de se déplacer, de capturer les proies, et de se défendre.

2.1.3 Adhésion chez les rémoras

Les rémoras sont des poissons possédant sur le sommet de la tête un disque adhésif (Figure 6A, B) (Wang *et al.*, 2017c). Celui-ci leur permet de se fixer au corps d'autres poissons plus gros, ainsi de profiter d'une locomotion sans dépense d'énergie, et des restes de nourriture. L'adhésion générée par le disque adhésif fait l'objet d'essais de reproduction dans le domaine de la robotique (Figure 6C, D).

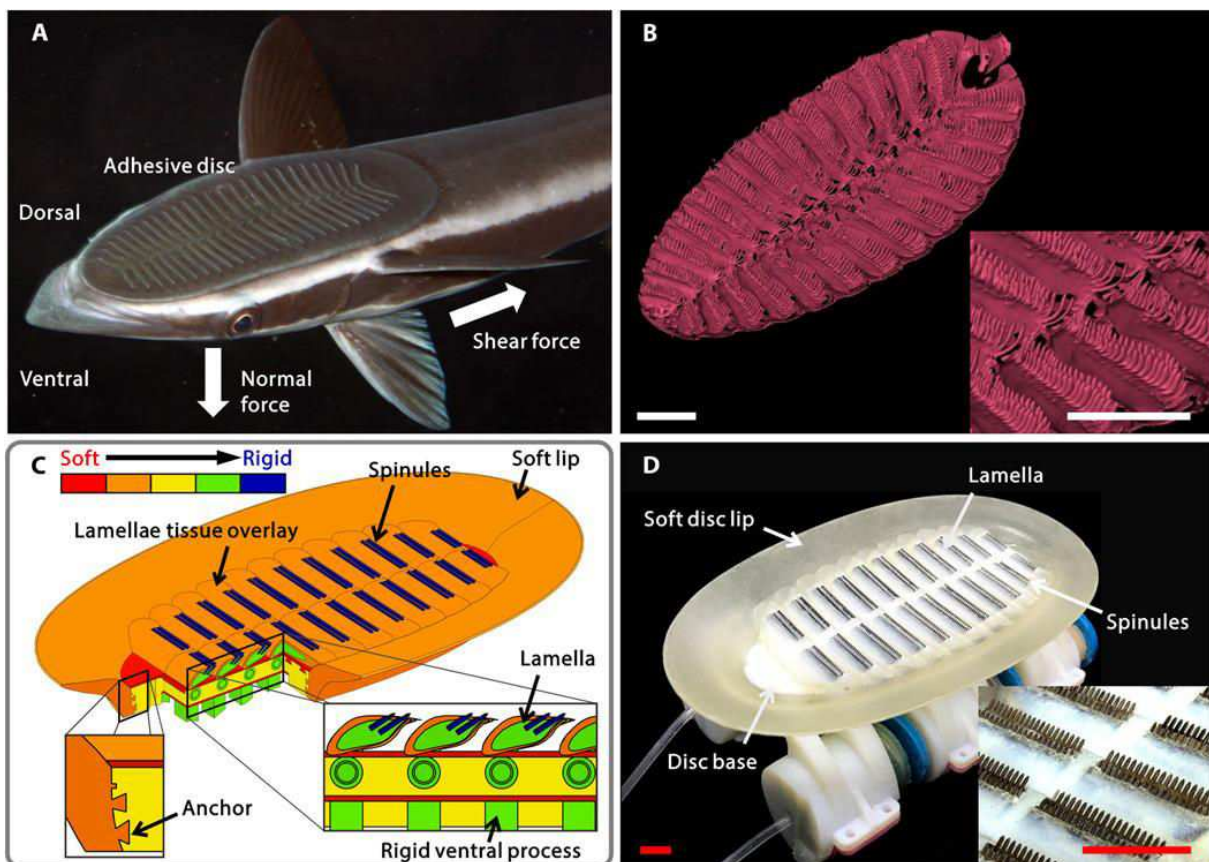


Figure 6 : A) Vue dorsale d'un rémora *Echeneis naucrates* (Photo : Klaus M. Stiefel). B) Reconstruction 3D du disque de remora à partir des données de microtomographie à rayon X (résolution, 35 μm). (Encart) Image proche des lamelles et des rangées de spinules. Barre d'échelle, 10 mm. C) Modèle CAD du disque de rémora biomimétique. D) Prototype du disque de rémora biomimétique (disc pad longueur, 127 mm; largeur, 62 mm). Barre d'échelle, 10 mm. (Encart) Vue des rangées des lamelles composites, avec des spinules en fibre de carbone. Adapté de Wang *et al.* (2018).

2.2 Adhésion chimique, réversible ou irréversible, chez nombre d'organismes

L'adhésion chimique est beaucoup plus répandue que l'adhésion mécanique, mais peut être accompagnée de celle-ci. Elle fait intervenir la sécrétion d'un adhésif, qui peut être réversible ou irréversible.

2.2.1 Adhésion chimique chez les plantes

Ce type d'adhésion s'observe chez certaines plantes carnivores, qui produisent des gouttelettes de colle pour capturer des proies (insectes, petits vertébrés), leur permettant de coloniser des sols pauvres en nutriments (Adlassnig *et al.*, 2010) (Figure 7).



Figure 7 : Détail des gouttes adhésives sécrétées à la surface des feuilles de *Drosera sp.* (à gauche, V Foulon). Visualisation en microscopie électronique à balayage des trichomes glandulaire de *Drosera capensis* à droite (Koch *et al.*, 2009).

Certaines espèces ont fait l'objet d'investigations concernant la composition de ces sécrétions, mettant en évidence deux types majeurs selon les genres taxonomiques : un mélange de polysaccharides, ou une résine lipophile.

Des mécanismes d'adhésion s'observent également chez les plantes au moment de la reproduction. Les grains de pollens des angiospermes présentent la caractéristique d'être dispersés de manière groupée, augmentant ainsi les probabilités de fécondation lorsque l'organisme vecteur rencontre une autre fleur. Ils sont liés entre eux par des structures diverses telles que des fluides (pollenkitt), appendices, fibres ou molécules adhésives enchâssées dans la membrane (Hesse, 2010; Pacini and Hesse, 2005). Certaines molécules adhésives identifiées chez les grains de pollen telles que la sporopollénine ont également été observées chez l'algue unicellulaire *Chlorella vulgaris* (Simerova *et al.*, 2013). Après dispersion, lorsqu'un grain de pollen rencontre un stigmate, des protéines aux propriétés adhésives permettant l'initiation de la fécondation et la transmission du patrimoine génétique aux cellules reproductrices femelles (Wang *et al.*, 2017a). De manière générale, la reproduction de tous les êtres vivants par la voie sexuée implique un phénomène d'adhésion, sans

lequel les gamètes ne peuvent fusionner. Ces mécanismes d'adhésion cellulaire font intervenir des protéines d'adhésion.

2.2.2 Sécrétions adhésives chez les arachnides et autres arthropodes

Les toiles d'araignées ne sont pas uniquement composées de fils de soie. En effet, les arachnides sécrètent des gouttelettes d'adhésifs lors de la construction de la toile (Figure 8), afin de capturer les proies (Opell *et al.*, 2018; Wolff *et al.*, 2015). Cette colle, hautement spécialisée pour adhérer à la cuticule des insectes est majoritairement composée de glycoprotéines.

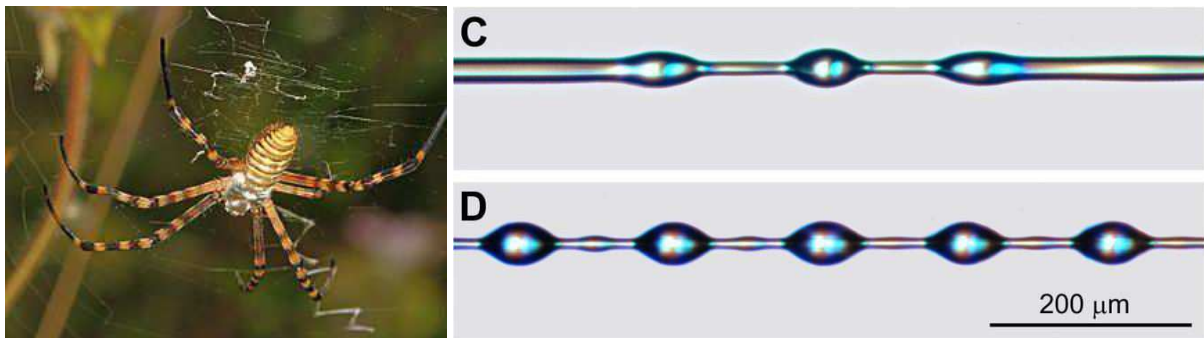


Figure 8 : *Argiope trifasciata* sur sa toile (à gauche). (C) Fil d'*Argiope trifasciata* montrant la formation des gouttes d'adhésif à partir d'un agrégat cylindrique d'adhésif. (D) Même fil observé 30 secondes plus tard après la formation des gouttelettes. Adapté de Opell *et al.* (2018). Photo de gauche : Judy Gallagher.

L'adhésif sécrété par les tiques (*Ixodida*) lors de la morsure a également fait l'objet d'études permettant de décrire les mécanismes de sécrétion et de définir une composition probablement majoritairement protéique (Suppan *et al.*, 2018).

La plupart des insectes possèdent également des glandes sécrétrices d'adhésif (Betz, 2010). De nombreuses fonctions peuvent être attribuées aux adhésifs d'insectes telles que la locomotion, la reproduction, la métamorphose, la défense passive ou active, la capture de proies, la construction d'abris, l'entretien d'appendices, le parasitisme, la phorésie... La diversité des molécules sécrétées reflète la diversité des usages.

2.2.3 Adhésion réversible chez les mollusques terrestres

Les mollusques terrestres gastéropodes laissent derrière eux une traînée de mucus. Cette substance principalement composée de polysaccharides et de protéines glycosylées présente des propriétés adhésives. Le mucus permet, par sa tension de surface, de rendre efficace la succion du pied, permettant ainsi la locomotion. Par ses caractéristiques, le mucus permet également de lubrifier le pied des gastéropodes. Ces gels ont des spécificités viscoélastiques intéressantes, et sont capables d'adhérer sur des surfaces humides (Smith, 2006). Le mucus est sécrété par des cellules spécialisées, localisées au sein de l'épithélium de ces organismes (Smith, 2010).

2.2.4 Adhésion réversible chez certains vertébrés

Certains vertébrés sécrètent également un mucus adhésif à la surface de leur épithélium. Parmi les amphibiens, les peaux de certaines espèces de grenouilles ont été largement utilisées dans les années 1930 pour produire des colles. Il n'est pas clair si ce sont les sécrétions adhésives de ces amphibiens ou bien les collagènes constituant les peaux qui étaient valorisés. Certaines espèces de salamandres sécrètent un adhésif de défense. Une récente étude portant sur l'espèce *Plethodon shermani* a mis en évidence un adhésif très hydraté, composé en majorité de protéines, mais dont la composition chimique diffère des adhésifs terrestres et marins déjà décrits dans la littérature (von Byern *et al.*, 2017).

L'adhésion chimique peut être étudiée chez de nombreux organismes, à différents niveaux d'échelles, macroscopique, microscopique et moléculaire. La plupart des adhésifs sécrétés par les organismes terrestres, à l'exception de ceux produits par les organismes aquatiques, sont actifs au contact de l'air et polymérisent en conditions relativement sèches. A l'inverse, les organismes marins produisent des colles efficaces en milieu humide. C'est probablement dans le milieu marin que l'on trouve le plus d'espèces capables de bioadhésion, et c'est dans ce milieu que la majorité des bioadhésifs ont été étudiés.

3 Les bioadhésifs dans le milieu marin

Dans le domaine des bioadhésifs, le milieu marin est particulièrement intéressant et source potentielle d'innovation. Cet environnement est un milieu souvent turbulent, incitant les organismes à se fixer afin de rester dans des zones favorables à leur développement. Cette situation est visible sur l'estran, zone de balancement des marées, où le nombre d'êtres vivants fixés aux rochers est important. Les espèces marines produisant des bioadhésifs synthétisent des mélanges moléculaires capables d'adhérer sous l'eau, et de résister à des conditions extrêmes. Pour les espèces vivant sur l'estran, les variations de température, l'exposition aux UV, l'exondation, les variations de salinité, sont autant de facteurs agressifs pour les bioadhésifs sécrétés. Aux organismes macroscopiques que nous pouvons observer, il faut ajouter l'ensemble des microorganismes que nous ne pouvons voir à l'œil nu. Chaque classe d'organisme présente ses propres caractéristiques d'adhésion, dont certaines ont déjà été étudiées. Les bioadhésifs d'origine marine présentent un avantage majeur : ils polymérisent naturellement dans l'eau. Ils résistent aussi à un milieu extrême soumis aux changements de température, à la pression, à l'exondation, à des concentrations élevées en sels, aux attaques de microorganismes, etc. L'étude des mécanismes d'adhésion chez les organismes marins a été largement motivée par la lutte contre le biofouling. Le biofouling est la colonisation d'un substrat par des

organismes, observé majoritairement en milieu humide, et particulièrement étudié dans le milieu marin (Callow and Callow, 2011). Une surface immergée va rapidement interagir avec le milieu, des molécules organiques vont adhérer sur cette surface (film primaire), puis des microorganismes (bactéries, champignons, microalgues) vont coloniser le substrat, permettant ensuite à des macroorganismes (macroalgues, crustacés, mollusques...) de se fixer (Figure 9).

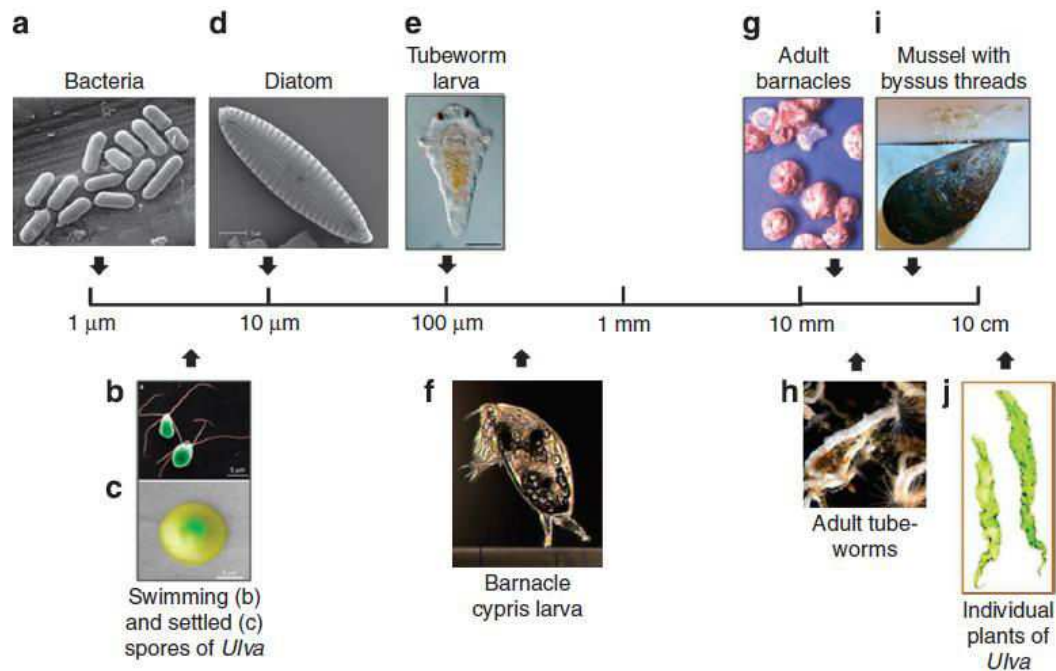


Figure 9 : Diversité et gamme de taille d'organismes représentatifs du biofouling. (a) Bactéries (Microscopie électronique à balayage (MEB)), (b) Image en MEB colorisée d'une spore mobile quadriflagellée d'algue verte *Ulva*, (c) fausse couleur d'image de MEB environnementale d'une spore adhérente montrant un anneau d'adhésif sécrété, (d) Diatomée en MEB (*Navicula*), (e) larve de ver *Hydroides elegans* (image B. Nedved), (f) Larve cypris de balane *Amphibalanus amphitrite* explorant une surface avec sa paire d'antennules (image N. Aldred), (g) Balanes adultes (image AS Clare), (h) Vers tubicoles adultes (*H. elegans*; image M. Hadfield), (i) Moule adulte montrant les filaments de byssus attachés à la surface (image J. Wilker), (j) Fronde individuelle d'algue verte *Ulva*. Le diagramme est destiné à indiquer les échelles relatives plutôt que les tailles absolues ; les espèces individuelles au sein d'un groupe peuvent varier de manière significative en taille absolue (Callow and Callow, 2011).

3.1 Bactéries et microorganismes

L'adhésion des bactéries marines est largement décrite. Elle peut être réversible, mais l'établissement du biofilm est généralement irréversible. Pour adhérer à un substrat, une cellule bactérienne peut utiliser diverses stratégies. Des appendices adhésifs, tels que les pili, peuvent maintenir la cellule en contact avec le substrat (Rubio, 2002). Les pili sont des structures protéiques (pilline, adhésine) éventuellement glycosylées, formant une ou plusieurs structures filiformes autour de la cellule bactérienne. Après l'adhésion initiale, la multiplication des cellules bactériennes va conduire à la formation d'un biofilm. Le biofilm est une structure pluricellulaire, souvent multi espèces (bactéries, champignons, microalgues) dans laquelle les cellules sont maintenues grâce à la sécrétion d'une

matrice extracellulaire adhésive (Figure 10). La composition de la matrice extracellulaire des biofilms est variée : polysaccharides (glycocalyx), protéines, ADN extracellulaire, lipides, molécules amphiphiles. Elle dépend de l'espèce, du milieu, des conditions environnementales, et des relations entre microorganismes (Flemming and Wingender, 2010).

Certaines microalgues, telles que les diatomées benthiques, sont capables de produire des mucilages adhésifs (Wetherbee *et al.*, 1998). La composition de la matrice extracellulaire adhésive de certaines diatomées est composée de polysaccharides, dont une partie est sulfatée (Wustman *et al.*, 1997), permettant des interactions ioniques avec des ions métalliques (Ca^{2+} , Mg^{2+}). Des protéines et des enzymes oxydo-réductrices pourraient également être impliquées dans la formation de la matrice extracellulaire (Buhmann *et al.*, 2014; Willis *et al.*, 2014). L'une des difficultés majeures rencontrées est la petite taille de ces organismes, qui rend très difficile la caractérisation moléculaire de leurs adhésifs.

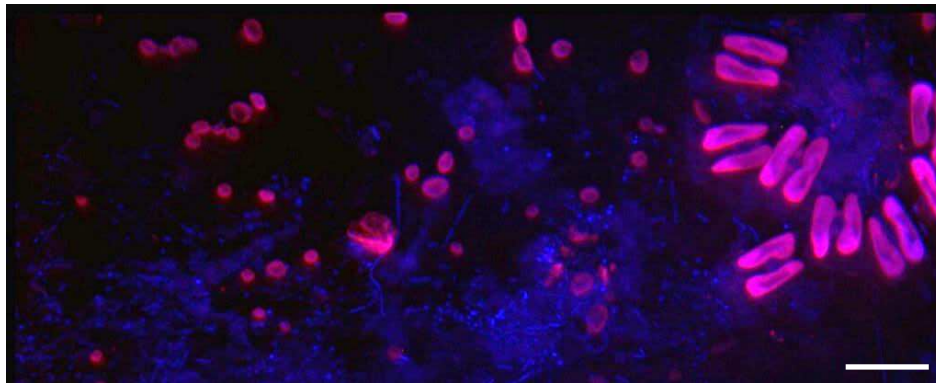


Figure 10 : Observation en microscopie à épifluorescence d'un biofilm multispécifique (bactéries en bleu, microalgues en rouge) adhérent à la surface de la fronde d'une algue verte. Barre d'échelle : 10 μm . Photo : V Foulon.

3.2 Macroalgues

L'adhésion des macroalgues débute dès l'installation des cellules reproductrices, à l'échelle microscopique. L'adhésion des spores et zygotes de macroalgues a été étudiée chez les *Chlorophyceae* du genre *Ulva* (Callow *et al.*, 2000a, 2000b, 1997; Miyamura *et al.*, 2010), et chez les cellules reproductrices de *Phaeophyceae* (Dimartino *et al.*, 2016; Vreeland *et al.*, 1993). La petite taille de ces cellules, et la faible quantité d'adhésif produit rend difficile leur caractérisation. Cependant, l'utilisation de techniques d'immunomarquage chez *Ulva* a permis de mettre en évidence la présence de glycoprotéines dans l'adhésif sécrété par les spores (Callow and Callow, 2006). La présence de polysaccharides et de protéines a également été mise en évidence par spectrométrie infrarouge chez des cellules reproductives d'algues brunes (Dimartino *et al.*, 2016). Chez le zygote de *Fucus*, la

constitution de la membrane cellulaire est directement impliquée dans l'adhésion, avec la présence de protéines apparentées à la vitronectine (Vreeland *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1992). Des polyphénols sont impliqués dans l'adhésion des algues brunes, ainsi que des enzymes haloperoxydases, qui permettent probablement d'initier des liaisons au sein de l'adhésif et avec le substrat, comme cela a largement été décrit chez la moule (Vreeland *et al.*, 1998). L'adhésion des macroalgues adultes, par les rhizoïdes, est peu documentée, mais fait probablement intervenir des stratégies d'adhésion similaires à celles des stades microscopiques (Field *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 1980). Ces structures spécifiques utilisent également l'adhésion mécanique, se développant dans les aspérités du substrat, initiant ainsi des points d'accroche multiples.

3.3 Crustacés

Les crustacés étudiés connus pour produire un adhésif sont ceux de l'infra-classe des *Cirripedia*. Ces organismes ont été étudiés très tôt, pour lutter contre leur adhésion, source de problèmes majeurs de biofouling sur les structures immergées et les navires (Delius and Tatro, 1912; Knight-Jones and Crisp, 1953).

L'adhésif des cirripèdes pédonculés a été décrit chez le genre *Lepas* (Barnes and Blackstock, 1974; Walkera and Youngson, 1975). Plus récemment, l'adhésion *Lepas anatifera* a été étudiée plus en détail (Jonker *et al.*, 2015), permettant de révéler une composition majoritairement protéique de l'adhésif. Chez les balanes (sous-ordre *Balanomorpha*), l'adhésif permet la jonction entre le substrat et les plaques carbonatées, contrairement aux anatifes, dont l'adhésif lie le pied au substrat. Chez l'adulte, l'adhésif majoritairement protéique (90%), est produit par des glandes localisées à la base de l'animal (Oliveira *et al.*, 1980). Certaines des protéines adhésives sécrétées par les balanes ont été isolées et identifiées, appelées *cement protein* (Kamino *et al.*, 1996, 2000). Six protéines ont été identifiées dans l'adhésif sécrété par la balane *Megabalanus rosa*, des protéines ou gènes homologues ont été identifiés chez *Amphibalanus amphitrite* et *Balanus albicostatus* (He *et al.*, 2018a; Kamino, 2016). Parmi ces protéines, certaines participent à l'adhésion entre le substrat et l'adhésif, d'autres semblent interagir directement avec le carbonate de calcium permettant l'adhésion du bouclier. D'autres protéines semblent impliquées dans la défense de l'adhésif. Enfin, des lipides jouent également un rôle important dans l'adhésion de la balane, permettant une préparation du substrat (Fears *et al.*, 2018).

Le rôle des lipides dans l'adhésion des balanes a d'abord été mis en évidence chez la larve *cypris* (Gohad *et al.*, 2014). La larve *cypris* possède un organe adhésif sensoriel lui permettant de choisir un substrat avant la métamorphose : les propagules. La larve explore le substrat avant de s'adhérer définitivement, utilisant les propagules pour se déplacer, et sécrétant un adhésif réversible (Walker,

1971). Avant la métamorphose, la larve s'immobilise en sécrétant un adhésif permanent. L'adhésif de la larve semble présenter des homologies avec l'adhésif adulte (He *et al.*, 2018a). La taille de la larve présente un frein majeur à l'étude de son adhésif, du fait de la faible quantité de matériel disponible.

3.4 Polychètes

Certains polychètes tubicoles vivent dans un tube formé par agrégation de grains de sable. Ces populations sont considérées comme des espèces architectes, pouvant modifier la topographie d'une plage en formant des récifs (Collin *et al.*, 2018). Les appendices permettant de capter les grains de sable et de les coller entre eux ont été décrits par Gruet *et al.* (1987) chez l'espèce *Sabellaria alveolata*. La première caractérisation protéique de l'adhésif sécrété par les polychètes tubicoles a été effectuée chez *Phragmatopoma californica* (Waite *et al.*, 1992), mettant en évidence la présence de DOPA.

Avant sécrétion, l'adhésif est constitué d'un système « bi-composant » avec des cellules contenant des granules homogènes, et des cellules contenant de granules hétérogènes. Ces granules sont formés par le phénomène de coacervation (Stewart *et al.*, 2004, 2017). Le rôle des interactions entre les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} et les protéines de l'adhésif est essentiel dans la complexation de l'adhésif (Wang and Stewart, 2013). Les protéines contenant des groupements DOPA et les protéines phosphorylées peuvent intervenir dans l'adhésion à la surface minérale des grains de sable (Flammang *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2004; Wang and Stewart, 2013). Une récente étude transcriptomique des glandes adhésives des espèces *S. alveolata* et *Phragmatopoma caudata* a permis d'identifier certains gènes impliqués dans les mécanismes chimiques de l'adhésion, codant notamment pour des protéines oxydo-réductrices impliquées dans la formation de la DOPA et de ses dérivés (Buffet *et al.*, 2018).

3.5 Echinodermes

Certains échinodermes possèdent des organes permettant la locomotion et la capture des proies : les *podia*. Chez les oursins, ces organes sont visibles tout autour de l'organisme, entre les spicules, tandis que chez les étoiles de mer, les *podia* sont localisés sur la face inférieure (Figure 11).



Figure 11 : Visualisation de *podia* d'oursin (à gauche) et d'étoile de mer (à droite). Photos : V Foulon.

Le *podia* est composé d'un tube contractile, au bout duquel une extrémité discale renflée est observée. Longtemps considérés comme des mini-ventouses, les *podia* sont en réalité des organes qui sécrètent un adhésif chimique réversible (Hennebert *et al.*, 2012a).

L'adhésif sécrété par les *podia* a été étudié chez l'étoile de mer *Asterias rubens* (Flammang *et al.*, 1998) et l'oursin *Paracentrotus lividus*. L'adhésion des *podia* est rendue possible par la présence de glandes sécrétant un mélange adhésif constitué de protéines et de polysaccharides (Hennebert *et al.*, 2011, 2012b), et d'une part inorganique apparemment importante (environ 40%) (Flammang *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2009). Le décollement des *podia* se fait probablement par la sécrétion d'enzymes (Lebesgue *et al.*, 2016), produites par des glandes spécifiques. Chez l'oursin, la Nectine semble être une protéine centrale de l'adhésion (Lebesgue *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2013), mais la composition protéique précise de cet adhésif reste incertaine. Chez l'étoile de mer, parmi les protéines identifiées dans l'adhésif sécrété, une *Sea star foot protein (Sfp-1)* a été caractérisée (Hennebert *et al.*, 2014b). Cette protéine est composée de sous unités présentant des domaines spécifiques de liaison aux protéines, carbohydrates et métaux, indiquant un rôle important dans la structure de l'adhésif (Hennebert *et al.*, 2014b).

Chez les échinodermes de la famille de *Holothuridae*, certaines espèces sont capables de sécréter un adhésif de défense. Cet adhésif se présente sous forme de filaments tubulaires appelés tubes de Cuvier (Flammang *et al.*, 2002). La composition de l'adhésif présent sur ces tubes est atypique dans le domaine des bioadhésifs avec 40% de polysaccharides et 60% de protéines. Une protéine proche du *precollagen D* présent dans le byssus des moules a été détectée dans cet adhésif (Flammang *et al.*, 2016), cependant, la caractérisation de cet adhésif produit par plusieurs espèces, reste à effectuer.

3.6 Mollusques

3.6.1 Organe d'adhésion : le pied

La plupart des espèces de l'embranchement des *Mollusca* possèdent un pied au stade adulte, dont le rôle diffère selon les classes (Figure 12). Ainsi, il présente un rôle dans la locomotion chez les *Aplacophora*, les *Monoplacophora*, les *Polyplacophora* et les *Gastropoda*. Chez les *Cephalopoda*, les tentacules et le siphon permettant la nage sont issus du pied. Enfin, chez les *Scaphopoda* et certains *Bivalvia*, le pied sert à l'enfouissement. Certains *Bivalvia* ne possèdent pas de pied au stade adulte, tels que l'huître *Crassostrea gigas*. En revanche, d'autres bivalves possèdent un pied hautement spécialisé dans l'adhésion par la sécrétion de filaments de byssus tels que les *Mytilidae*.

Chez les espèces de la classe des *Bivalvia* et des *Gastropoda*, l'apparition du pied est généralement observée à la fin de la phase de développement larvaire pélagique, indiquant le passage du stade véligère (larve nageante) au stade pédivéligère (larve capable de s'adhérer) (Wanninger, 2015). Le pied semble jouer un rôle important dans le choix du site de métamorphose, en permettant notamment l'exploration du substrat. Il permet également la sécrétion d'un adhésif utilisé pour immobiliser la larve sur un substrat avant la métamorphose. Ce comportement général semble être observé chez l'ensemble des espèces de la classe des *Bivalvia*. Ce phénomène d'adhésion au stade larvaire, marquant la transition entre un stade de vie pélagique et une vie benthique a cependant été très peu étudié. Les quelques références disponibles sont relativement anciennes et concernent principalement 4 espèces de mollusques bivalves marins : *Ostrea edulis*, *Crassostrea virginica*, *Mytilus edulis* et *Pecten maximus* (Cranfield, 1973a; Elston, 1980; Gruffydd *et al.*, 1975; Lane and Nott, 1975).

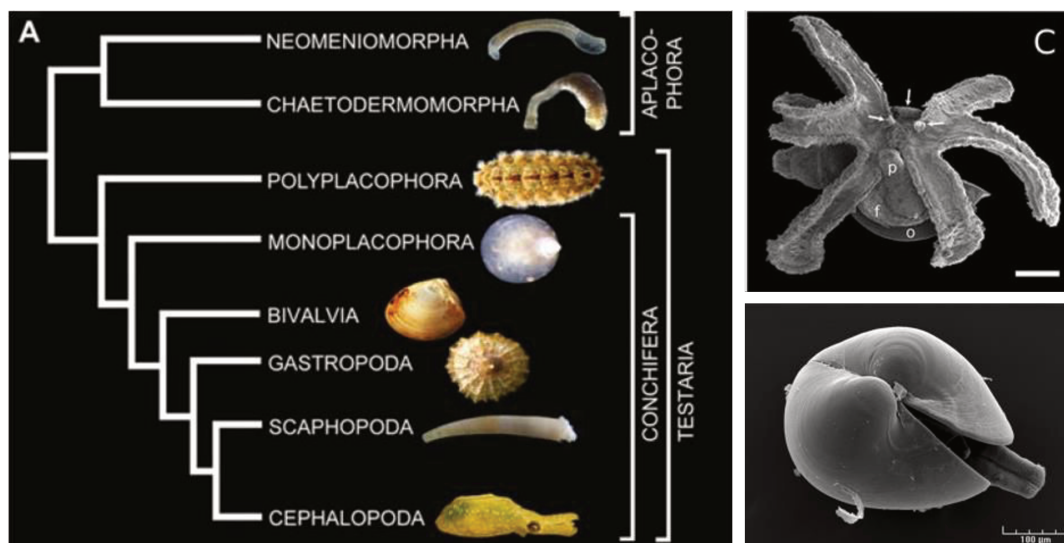


Figure 12 : Interrelations entre les classes taxonomiques de mollusques, basées sur des données morphologiques d'après Waller (1998) (Wanninger, 2015). A droite, larve pédivéligère de gastéropode *Strombus pugilis* (en haut – barre d'échelle 10µm) (Enriquez-Diaz *et al.*, 2015) et de bivalve *Crassostrea gigas* (en bas). Chez ces deux classes d'organisme, le pied apparaît au stade pédivéligère.

3.6.2 Le byssus, bioadhésif modèle

Les études portant sur les bioadhésifs produits par les mollusques bivalves sont beaucoup plus nombreuses pour le stade adulte. Ainsi, les organismes qui regroupent le plus grand effort de recherche dans le domaine des bioadhésifs sont des mollusques bivalves : les moules. Les moules vivent attachées à un substrat par le biais d'un adhésif filamenteux, le byssus. Les études publiées portent majoritairement sur le byssus de moules marines (famille des *Mytilidae* et des *Pinnidae*) (Brazeo and Carrington, 2006; Harrington and Waite, 2007; Jackson *et al.*, 1953; Kádár and Bettencourt, 2008; Lucas *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2016; Waite and Tanzer, 1980; Waite *et al.*, 1989) : *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. californianus*, *M. coruscus*, *Pinna nobilis*, *Geukensia demissa*, *Modiolus modiolus*, *Bathymodiolus thermophilus*, *B. azoricus*, et quelques espèces d'eau douce (Anderson and Waite, 2002; Eckroat *et al.*, 1993) : *Dreissena polymorpha*, *D. bugensis*.

Le byssus est sécrété par le pied, hautement spécialisé pour cette fonction (Figure 13). Il est constitué d'un filament protéique, ancré d'une part au tissu de la base du pied et de l'autre part au substrat. La majorité des protéines composant le byssus ont été identifiées pour les espèces du genre *Mytilus*.

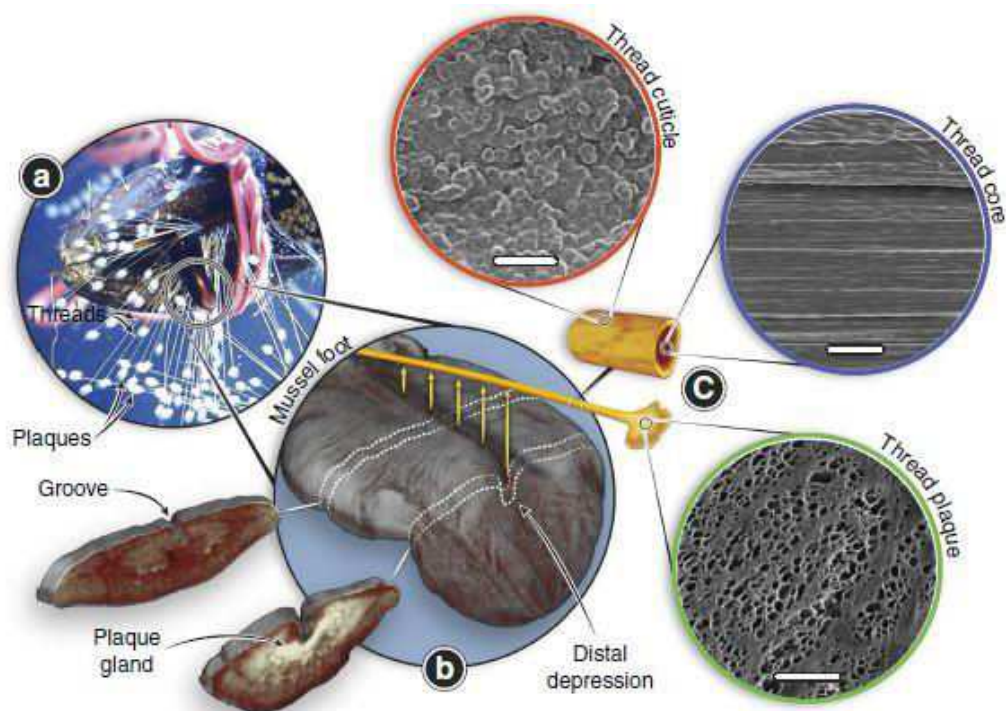


Figure 13 : (a) Photo d'une moule en train d'extruder des filaments de byssus sur une surface en plexiglas avec son pied. Notez les nombreux filaments déjà déposés. (b) image de microtomographie de rayon X de la surface ventrale d'un pied de moule coloré à l'iode avec deux sections découpées pour montrer la glande interne et la structure de gorge au milieu du pied et près de la dépression distale. Les filaments de byssus sont synthétisés un à un en sécrétant des blocs de construction de protéines dans le sillon situé sur la face ventrale du pied de la moule. (c) Schéma d'un seul filament byssal, avec des images de microscopie électronique à balayage mettant en évidence les morphologies complexes à l'échelle micrométrique de la cuticule protectrice (échelle, 3 mm), du noyau fibreux (échelle, 5 mm) et de la plaque adhésive (échelle, 50 mm) (Priemel *et al.*, 2017).

Typiquement, un filament de byssus est composé d'une dizaine de protéines : des protéines de type collagène composent le filament (90% du poids sec), la mfp1 (mussel foot protein 1) compose la cuticule du byssus, assurant sa protection, d'autres mfp localisées dans la plaque byssale, permettant le lien entre les collagènes du filament, et le substrat (Waite, 2017). La modification des tyrosines en DOPA (ou catéchol) au sein des mfp est une caractéristique largement étudiée du byssus, jouant un rôle majeur dans les propriétés adhésives de ces protéines. En effet, la DOPA permet par des mécanismes d'oxydo-réduction d'initier l'adhésion sur le substrat (liaisons covalentes, interactions de van der Waals), et la cohésion entre les protéines du byssus (liaisons covalentes, interactions ioniques) (Figure 14) (Wilker, 2011).

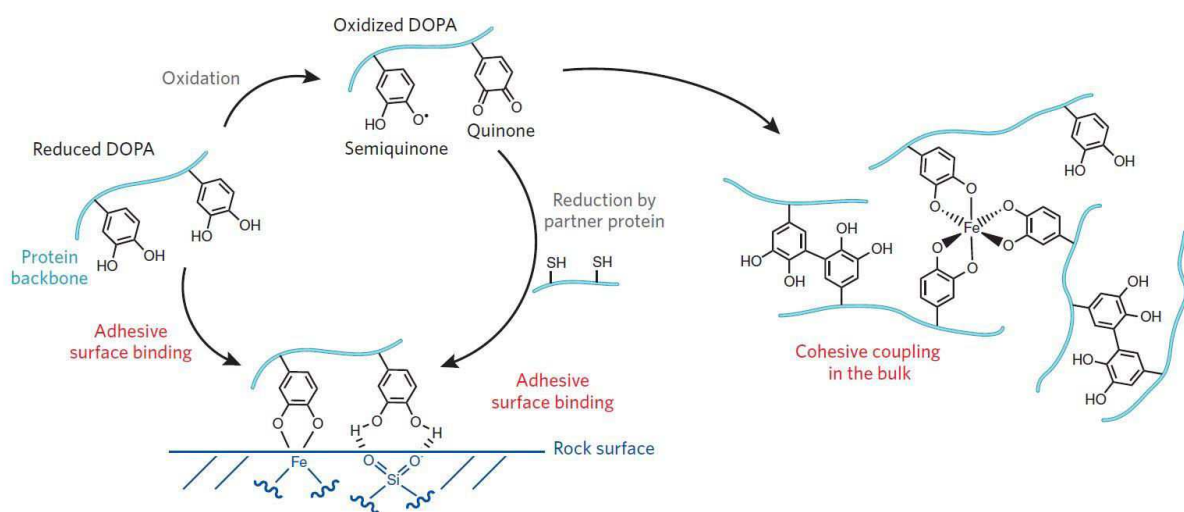


Figure 14 : La forme réduite (catéchol) de la DOPA lie directement la surface pour l'adhésion des protéines (gauche). Les formes oxydées de la DOPA (semiquinone et quinone), peuvent être réduites par un partenaire protéique riche en groupement thiol, pour retrouver une fonction d'adhésion. La cohésion de l'adhésif peut être maintenue par la présence d'ions métalliques et l'oxydation, incluant le couplage des radicaux (à droite). Adapté de J. Wilker (2011).

Les filaments de byssus sont également produits chez certaines espèces semi-sessiles de la famille des *Pectinidae*. *Chlamys farreri* est la seule espèce de cette famille étudiée pour son adhésion (Miao *et al.*, 2015). Neuf « byssal scallop protein » ont été identifiées, dont les propriétés semblent différentes des Mfp suggérant des stratégies d'adhésion différentes, et la nécessité de recherches plus approfondies pour caractériser ce byssus. La chimie des groupements catéchol est l'objet de multiples applications, au-delà du domaine des bioadhésifs (Patil *et al.*, 2018).

4 L'huître creuse *Crassostrea gigas*, nouveau modèle d'étude de la bioadhésion

Crassostrea gigas (Thunberg, 1793), est un mollusque bivalve de la famille des *Ostreidae*. Récemment, proposé comme reclassé dans le nouveau genre *Magallana* (Salvi and Mariottini, 2016), les noms d'espèce *Magallana gigas* et *Crassostrea gigas* sont aujourd'hui tous deux acceptés (Bayne *et al.*, 2017). Pour des facilités de référencement, le nom *Crassostrea gigas* sera utilisé dans cette thèse, comme proposé par Bayne *et al.* (2018).

4.1 Répartition géographique et élevage

C. gigas est communément appelée huître japonaise, huître creuse ou huître du Pacifique (Pacific oyster) décrivant sa morphologie et son origine : elle présente une coquille inéquivalve avec une valve gauche plus creusée que la droite, et est originaire des côtes du Nord Est de l'Océan Pacifique (Evseev *et al.*, 1996). Aujourd'hui, il est possible d'observer *C. gigas* entre les latitudes de 65°N et 50°S (Miossec *et al.*, 2009). Sa dispersion de par le monde a probablement débuté avec les premières routes maritimes entre l'Asie et l'Europe au XVII^{ème} siècle, mais l'importation volontaire de cette espèce pour répondre aux besoins de l'ostréiculture au XX^{ème} siècle explique aujourd'hui sa large aire de répartition. En France, *C. gigas* fut introduite au début des années 1970 pour pallier aux mortalités observées par les ostréiculteurs chez *Ostrea edulis* (huître plate) et *Crassostrea angulata* (huître portugaise) (Grizel and Héral, 1991).

C. gigas est l'organisme marin le plus produit au monde avec environ 4,4 millions de tonnes annuelles (FAO 2015). La Chine, avec plus de 80% de la production est officiellement le premier producteur mondial, malgré les incertitudes d'identification des différentes espèces produites dans ce pays (*C. gigas*, *C. angulata*, *C. hongkongensis*...). La France est le premier producteur Européen et 4^{ème} mondial avec une moyenne de 100 000 tonnes/an. L'ostréiculture est traditionnellement basée sur le captage des larves d'huître dans le milieu naturel (Arakawa, 1990). Ainsi, des structures artificielles sont immergées en mer, proches des zones de reproduction naturelles, permettant aux larves pélagiques présentes dans le milieu de coloniser leurs surfaces. Elles sont ensuite récupérées et les naissains (huîtres juvéniles) sont placés en condition d'élevage pour favoriser leur croissance (Joly *et al.*, 1989). Depuis que la reproduction de *C. gigas* a été maîtrisée, la production commerciale de naissain en écloséries a été progressivement développée, afin d'offrir une alternative au captage naturel, soumis aux aléas des conditions environnementales des zones côtières (Miossec *et al.*, 2009). Cette opportunité a également permis le développement de l'ostréiculture dans des zones pauvres en captage naturel, et/ou éloignées des zones de captage naturel. Ceci a contribué à l'expansion de

l'aquaculture de *C. gigas*, permis la production d'huîtres triploïdes et la mise en œuvre de programmes de sélection génétique (Boudry, 2009). Cette espèce d'intérêt économique a été largement étudiée afin de comprendre son cycle de vie, sa biologie et ses facultés d'adaptation la rendant invasive. Ceci en a fait un organisme modèle en biologie marine.

4.2 Reproduction et développement

A l'état naturel, *C. gigas* vit fixée sur des substrats durs au niveau de la zone intertidale dans des environnements peu agités. L'adhérence à la surface du substrat à l'âge adulte se fait par la sécrétion de la coquille de la valve gauche directement sur le substrat (Yamaguchi, 1994). La coquille prend donc la forme du substrat colonisé permettant une très forte accroche. *C. gigas* peut également vivre libre à la surface du substrat dans les vasières, initialement fixée sur une petite particule dure (caillou, coquille adulte...). *C. gigas* se retrouve jusque dans les estuaires, supportant des variations de salinité importantes (Bayne, 2017).

C. gigas est un organisme benthique mais qui présente, comme tous les bivalves, une phase larvaire pélagique (Figure 15). Pour la reproduction, l'huître est généralement hermaphrodite alternée (Dheilly *et al.*, 2012; Normand *et al.*, 2009). Ainsi, les gamètes mâles et femelles sont émis entre Juin et Septembre, généralement lorsque la température de l'eau dépasse 20°C. L'émission des gamètes est également dépendante de multiples facteurs environnementaux (courant de marée, cycles) (Bernard *et al.*, 2016).

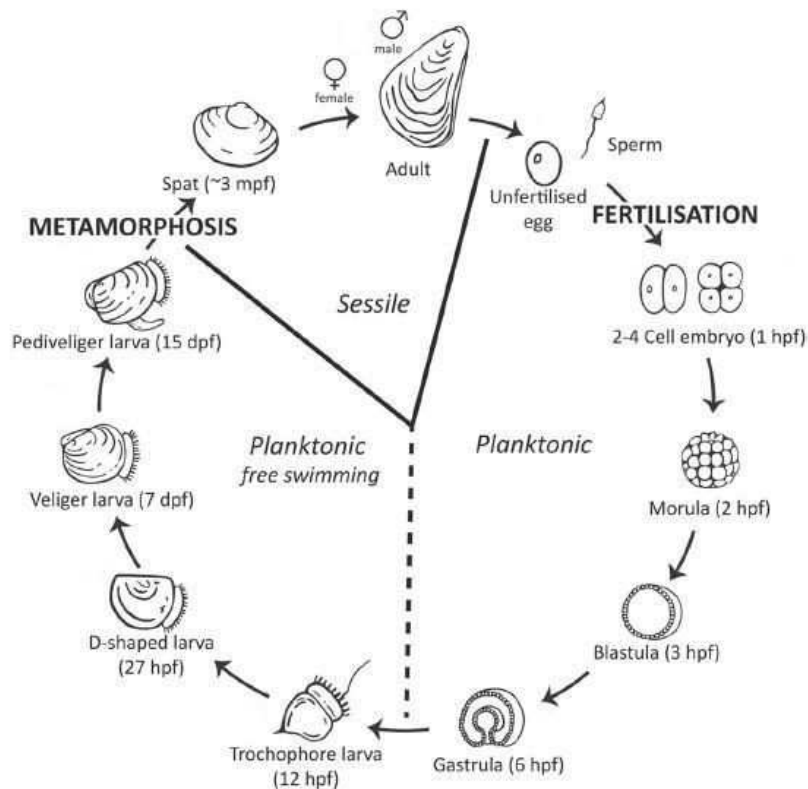


Figure 15 : Cycle de vie de l'huître *Crassostrea gigas*. hpf : heure post-fécondation, dpf : jour post-fécondation, mpf : mois post-fécondation (Vogeler *et al.*, 2016).

Après rencontre des gamètes et fécondation, le zygote se développe rapidement pour atteindre le stade trochophore au bout de quelques heures. Jusqu'à ce stade, la larve vit sur ses réserves énergétiques (autotrophie). La coquille se développe ensuite, en forme de D entre 24 et 48h après la fécondation (stade larve D). La larve véligère « D », d'une taille de 70 à 100µm, présente un vélum, un organe cilié permettant à la larve de nager et de s'alimenter par filtration du phytoplancton (mixotrophie, puis hétérotrophie stricte). La coquille se développe les jours suivants, faisant disparaître la forme typique de « D ». La larve est alors dite véligère, et mesure jusqu'à 250µm au bout de 12 à 20 jours après la fécondation (Bayne, 2017). A cette taille, apparaît la tâche océlaire, aussi appelée « œil ». Probablement photosensible, cette tâche sombre située de part et d'autre des deux valves permettrait à la larve de s'orienter vis à vis de la lumière (Coon *et al.*, 1990; Waller, 1981). L'apparition de la tâche océlaire est concomitante avec le développement du pied. La larve est alors au stade pédivéligère, elle mesure entre 250 et 300µm et est prête pour la fixation et la métamorphose.

Le stade pédivéligère marque la transition entre la vie pélagique et la vie benthique. La larve arrête de nager pour atteindre le substrat et se fixe définitivement par la sécrétion d'un adhésif liant la coquille au substrat. Le pied joue alors un rôle majeur lors de la fixation.

La métamorphose débute immédiatement après la fixation, le vélum, et le pied disparaissent, laissant place à la morphogenèse des organes adultes. La jeune huître est appelée naissain.

5 Problématiques scientifiques et objectifs

C. gigas a été largement étudiée en tant qu'organisme modèle en biologie marine (Bayne, 2017). Un premier assemblage du génome de *C. gigas* a été publié en 2012 (Zhang *et al.*, 2012), permettant d'élargir les champs de recherche sur cet organisme. Cette espèce est donc l'une des espèces marines les plus décrites et documentées. Cependant, un phénomène biologique essentiel de son cycle de vie est peu étudié : l'adhésion au stade pédivéligère. L'une des premières études de l'adhésion chez l'huître remonte pourtant au début du XX^{ème} siècle et concerne *C. virginica* (Nelson, 1924). Mais la plupart des données disponibles sur ce processus concernent majoritairement l'optimisation du recrutement larvaire dans un objectif productif pour l'ostréiculture (Arakawa, 1990; Fitt *et al.*, 1990; Korringa, 1940; Robert and Gérard, 1999). Quelques études anciennes se sont intéressées à la composition de l'adhésif sécrété par les larves pédivéligères de mollusques bivalves (Cranfield, 1973a; Gruffydd *et al.*, 1975; Lane and Nott, 1975), mais aucune n'a investigué la composition de la substance adhésive produite à ce stade chez l'espèce *C. gigas*. Cette matrice adhésive permet pourtant à la larve de se fixer à un substrat pour le reste de sa vie et est donc une étape importante de son développement. Cette étape est également cruciale dans le domaine de l'ostréiculture, déterminant l'efficacité des captages d'huîtres en milieu naturel, mais aussi l'efficacité de production de naissain dans les éclosiers.

D'autre part, ce bioadhésif marin efficace en milieu aquatique présente une résistance élevée. En effet, lorsqu'une larve pédivéligère se fixe sur un substrat, même très lisse, il est possible de la déloger mais l'empreinte d'adhésif sécrété sera très difficile à retirer. L'étude de ce bioadhésif pourrait permettre par biomimétisme, l'émergence de nouvelles colles adaptées à l'adhésion en milieu humide. Cependant, les modalités de biosynthèse et de sécrétion de ce bioadhésif chez *C. gigas* sont actuellement inconnues.

L'objectif principal de cette thèse est donc de décrire l'adhésion de la larve pédivéligère de *C. gigas* au stade pédivéligère, et d'effectuer une caractérisation moléculaire de l'adhésif sécrété à ce stade. Deux questions scientifiques majeures concernant le phénomène d'adhésion chez *C. gigas* ont donc été posées :

- 1) **Quelles sont les caractéristiques morphologiques de la larve pédivéligère et de l'adhésif sécrété à ce stade chez *C. gigas*?**
- 2) **Quelle est la composition moléculaire et quels sont les groupements chimiques qui composent l'adhésif de la larve pédivéligère de *C. gigas* ?**

Afin de répondre à ces problématiques scientifiques, cette thèse est présentée en 5 parties :

- **Chapitre II : Présentation des méthodologies adaptées à l'étude de l'adhésif sécrété par la larve pédivéligère de *C. gigas*.**

Afin de répondre aux problématiques scientifiques, de multiples solutions techniques ont été utilisées. La petite taille de l'organisme étudié et la faible quantité d'adhésif sécrété est l'enjeu majeur de cette étude. Cela a nécessité l'adaptation des protocoles existants et le développement de méthodes précises et sensibles. Le chapitre II présente de manière détaillée le matériel et les méthodes utilisés lors de cette thèse.

- **Chapitre III : Description de la sécrétion de l'adhésif par le pied de la larve pédivéligère de *C. gigas* et caractérisation moléculaire globale.**

Afin de comparer et de déterminer s'il existe des similitudes avec les autres espèces de bivalves déjà étudiées, une description morphologique de la larve pédivéligère de *C. gigas* et de l'adhésif sécrété à ce stade a été effectuée. La composition globale de l'adhésif, par des méthodes de spectrométrie, a également été déterminée, permettant de définir les méthodes analytiques modernes à employer afin de caractériser cet adhésif. Le chapitre III présente une description globale des sécrétions d'adhésif par la larve de *C. gigas*.

- **Chapitre IV : Recherche de gènes impliqués dans la sécrétion et la composition de l'adhésif de *C. gigas*.**

La disponibilité du génome chez cette espèce est un levier qui permet de pallier la faible quantité de d'adhésif disponible. Afin de déterminer les gènes potentiellement impliqués dans l'adhésion de la larve, une sélection a été effectuée parmi les données transcriptomiques disponibles lors de la publication du génome de *C. gigas*. Les résultats obtenus ont pu être discutés avec les motifs moléculaires observés chez d'autres bioadhésifs, permettant de proposer un modèle conceptuel de la composition de l'adhésif produit au stade pédivéligère chez *C. gigas*.

- **Chapitre V : Etude des protéines intervenant dans l'adhésion de la larve pédivéligère de *C. gigas*.**

Plusieurs stratégies d'analyse protéomique ont été menées afin d'identifier des protéines impliquées dans l'adhésion de la larve pédivéligère. Le frein majeur de ces analyses a été la faible quantité de matière disponible, et la résistance de ce bioadhésif aux extractions protéiques. Cependant, l'ensemble de ces investigations a permis d'identifier des protéines intervenant probablement dans le

phénomène d'adhésion chez *C. gigas*. Ceci a permis de valider certaines hypothèses formulées dans le chapitre IV et d'affiner la description moléculaire de ce bioadhésif.

- **Chapitre VI : Discussion générale.**

Enfin, l'ensemble des résultats obtenus et des conclusions formulées dans les différentes parties de la thèse ont été discutées. Ceci permettra de mettre en avant les hypothèses conceptuelles validées par nos approches analytiques. Les études complémentaires nécessaires dans la continuité de ce travail seront également présentées. L'ensemble de ces travaux seront replacés dans un contexte plus global, permettant d'identifier les valorisations possibles de ces résultats.

CHAPITRE II

Matériels et méthodes

Ce chapitre a pour objectif de présenter les différentes techniques et méthodes développées et utilisées dans cette thèse. Il permettra au lecteur de pouvoir prendre connaissance de l'ensemble des protocoles utilisés avec des informations plus précises que celles fournies dans les chapitres de cette thèse. Un rappel bref des méthodes utilisées sera néanmoins présenté dans l'introduction de chacun des chapitres.

1 Matériel biologique : production des larves pédivéligères

L'ensemble de cette étude porte sur le stade larvaire de *C. gigas*. Il n'est pas concevable de récupérer des larves pédivéligères de *C. gigas* dans le milieu naturel en quantité suffisante. Le cycle de vie de *C. gigas* est maîtrisé en laboratoire, ce qui permet une production contrôlée de larves, et l'utilisation d'un matériel biologique homogène et de qualité.

Les larves de *C. gigas* ont été produites sur le site expérimental Ifremer d'Argenton (Finistère, France) comme décrit par Petton *et al.* (2013). Les différentes expérimentations ont été effectuées à partir de plusieurs élevages larvaires au cours de l'année 2016, 2017 et 2018. Les larves ont été obtenues par fécondation *in vitro* entre gamètes mâles et femelles d'individus élevés en milieu naturel (48° 34' 29.976" N, 4° 36' 18.378" O, Aber-Benoît, Finistère, France). Les géniteurs ont été conditionnés durant 6 semaines à 19°C, dans des bacs de 500L.

- Les gamètes d'individus matures mâles et femelles (n=10 à 20) ont été obtenus par stripping (scarification des gonades), libérant ainsi les ovules et spermatozoïdes. Les gamètes ont été filtrés à 100µm et 20µm afin d'éliminer les débris cellulaires et placés dans de l'eau de mer filtrée sur 1µm et traitée aux UV (EMF).
- Le nombre de gamètes a ensuite été estimé par comptage sous microscope (x100 et x400), puis la mise en contact a été effectuée dans 5L d'EMF à une concentration de 100 ovules par mL avec un ratio de 100 spermatozoïdes par ovule.
- Après 1h, les ovocytes fécondés ont été placés dans un volume de 250 L à 21°C durant 48h pour poursuivre leur développement.
- Après 48h, les larves « D » ont été prélevées sur un tamis de 40µm et transférées dans des cylindres d'élevage d'une contenance de 5L à une concentration de 50 larves par mL. Ces larves ont été maintenues en flux continu à 25 °C, 34 PSU, pH 8,2 à 8,3, 95 à 100% d'O₂ saturée et nourries *ad libitum* par des cultures de microalgues (*Tisochrysis lutea* et *Chaetoceros sp.*, Souche CCAP 1010-3) à la concentration de 1500 µm³.µL⁻¹ en sortie.
- A J14 ou J15 post-fécondation, lorsque le taux de larves oeillées (larve présentant une tâche oculaire) était supérieur à 50%, les larves ont été échantillonnées et placées dans les tamis de

fixation. Les tamis de fixations sont constitués d'un cadre soutenant une maille de 100 μ m à travers lesquels un flux d'eau continu est maintenu, avec une alimentation identique à la condition précédente, à une température de 21°C. De la micro-brisure de coquille d'huître (OVIVE SA – taille comprise entre 200 et 350 μ m) a été ajoutée dans les tamis, servant de substrat de fixation pour les larves. La capacité des larves à se fixer a été vérifiée par observation sous loupe binoculaire (grossissement x50). Afin de pouvoir étudier les larves pédivéligères lors de leur fixation, des substrats spécifiques ont également été placés dans les tamis de fixation. Du verre dépoli a été choisi pour les observations en microscopie et l'analyse protéomique. De l'inox 316 L poli, compatible avec des analyses en spectroscopie infrarouge a également été utilisé. Les substrats ont été récupérés après 24h d'immersion, et traités selon les différentes analyses envisagées.

2 Observations morphologiques

2.1 Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage permet de visualiser la surface d'un échantillon avec une résolution à l'échelle nanométrique. Un faisceau d'électron est projeté en balayage sur l'échantillon. La détection des électrons ayant interagi avec la surface de l'échantillon va permettre d'obtenir une image détaillée de la topographie de surface de l'échantillon, mais également d'obtenir la composition atomique de cette surface par l'analyse de rayon X à dispersion d'énergie (EDS). Cette technique a permis d'effectuer une description précise de structures biologiques externes de la larve de *C. gigas* au stade pédivéligère, et de l'adhésif qu'elle sécrète. La méthode de préparation des échantillons biologiques utilisée est relativement classique. Cependant quelques adaptations liées au matériel biologique ont été ajoutées : i) l'anesthésie des larves d'huître afin que la coquille reste ouverte, ii) l'ajustement de l'osmolarité des solutions à 1100 mosmol.L⁻¹, compatible avec les échantillons marins.

2.1.1 Préparation des larves

- Des larves pédivéligères avant adhésion (en phase de « *crawling* ») (n = 100) et des larves fixées sur des plaques de verre (n = 100) depuis moins de 24h ont été anesthésiées avec une solution de MgCl₂ 5% pendant 30 min, selon le protocole adapté de Suquet *et al.* (2009).
- Les larves ont ensuite été fixées par une solution de glutaraldéhyde 1,5% dans un tampon de cacodylate de sodium 0,1M (NaCl 1,75% m/v pH 7,2) à 4°C pendant 2 h.
- Les larves ont été rincées trois fois 5 minutes dans une solution de cacodylate de sodium 0,1M et déshydratées par immersions successives dans des solutions d'éthanol de concentrations croissantes : 2x10min EtOH 50, 2x10min EtOH 70, 2x10min EtOH 90, 3x15min EtOH 100.

- La déshydratation finale a été effectuée par des bains dans des concentrations croissantes d'hexamethyldizilazane (HMDS) : 15min HMDS : EtOH 100 (1 : 3), 15min HMDS : EtOH 100 (1 : 1), 15min HMDS : EtOH 100 (3 : 1) et 3x15min HMDS pur.
- Les larves ont ensuite été métallisées sous vide par dépôt d'une couche d'or palladium. Cette étape permet de rendre l'échantillon conducteur et donc visible en microscopie électronique.
- Les échantillons ont ensuite été observés au microscope électronique à balayage Hitachi S-3200N à la plateforme d'imagerie et de mesures en microscopie de l'UBO.

2.1.2 Visualisation de l'adhésif

- Pour la visualisation de l'adhésif, des larves (n=10) ayant adhéré depuis moins de 24h sur une lame de verre ont subi le même protocole que précédemment jusqu'à la déshydratation par HMDS.
- Les larves ont ensuite été décollées du substrat à l'aide de micro-pinces, retournées et placées sur un ruban adhésif en carbone. Le substrat a été conservé.
- Les échantillons ont été métallisés par dépôt d'une couche de carbone permettant l'analyse EDS. Les observations des larves et des empreintes d'adhésif ont été effectuées sur le même microscope.

2.2 Histologie

L'histologie permet de visualiser et de décrire les structures tissulaires composant un organisme, à l'échelle micrométrique. Les colorations appliquées à l'échantillon peuvent indiquer la composition de certains tissus. Une coloration « classique » hématoxyline/éosine a été utilisée sur les larves pédivéligères permettant de décrire les tissus impliqués dans la phase d'adhésion (Gabe, 1968). Une coloration tétrachrome a également été utilisée permettant de mettre en évidence les polysaccharides présents dans les glandes du pied des larves pédivéligères (Costa and Costa, 2012). Une recherche de groupements oxydo-réducteurs a été réalisée par une coloration au nitro-bleu de tétrazolium (Paz *et al.*, 1991). Une coloration selon la méthode de Arnow (1937) a également été effectuée afin de détecter les groupements catéchol.

- Des larves pédivéligères avant adhésion, en phase de « *crawling* » (n = 1000) ont été anesthésiées avec une solution de MgCl₂ 5% pendant 30 min selon le protocole adapté de Suquet *et al.* (2009).
- Ces larves ont été fixées dans un fixateur Davidson modifié (12% v : v de formaldéhyde, 15% v : v d'éthanol et 5% v : v d'acide acétique) pendant 24h à 4 °C.
- Ces larves ont ensuite été décalcifiées par une solution d'acide ascorbique à 3% pendant 12 h à 4°C (Audino *et al.*, 2015).

- Les échantillons ont été déshydratés par immersions successives dans des concentrations croissantes d'alcool : 1h EtOH 70, 1h EtOH 80, 1h EtOH90, 2x2h EtOH 90, 1h EtOH 100, 12h EtOH 100, 1h EtOH 100, 1h Claral[®], 2h Claral[®].
- Les larves ont ensuite été incluses en paraffine.
- Des sections en série de 5µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome.

2.2.1 Coloration hématoxyline - éosine

- Les coupes ont été déparaffinées, réhydratées, colorées et déshydratées : 2x5min Claral[®], 2x5min EtOH 100, 5min EtOH 90, 5min EtOH 70, 5min eau distillée, 2min30 Hématoxyline de Harris, 3min eau courante, 2min acide acétique 1%, 3min Eosine Y 1g.L⁻¹, 5min EtOH 90, 5min EtOH 100, 2x5min Claral[®], montage entre lame et lamelle avec résine Eukitt[®].

2.2.2 Coloration tetrachrome

- Les coupes ont été déparaffinées, réhydratées, colorées et déshydratées : 2x5min Claral[®], 2x5min EtOH 100, 5min EtOH 90, 5min EtOH 70, 5min eau distillée, 30min Bleu d'Alcian (1% bleu d'Alcian dans 3% acide acétique filtré), eau distillée, 7min acide périodique, eau distillée, 15min réactif de Schiff, eau distillée, 2min hématoxyline de Gill n°3, eau distillée, 5min acide picrique (saturée, filtré) à 55°C, eau distillée, 5min EtOH 90, 5min EtOH 100, 2x5min Claral[®], montage entre lame et lamelle avec résine Eukitt[®]. Des empreintes d'adhésif ont également été colorées après décollement des larves selon le même protocole.

2.2.3 Coloration au nitro-bleu de tétrazolium (NBT)

- Les coupes ont été déparaffinées, réhydratées, colorées et déshydratées : 2x5min Claral[®], 2x5min EtOH 100, 5min EtOH 90, 5min EtOH 70, 5min eau distillée, 2h NBT (NBT 1mg.mL⁻¹ dans une solution de glycinate de potassium à 2M), 2h borate de sodium 0,16M, eau distillée, 5min EtOH 90, 5min EtOH 100, 2x5min Claral[®], montage entre lame et lamelle avec résine Eukitt[®]. Des empreintes d'adhésif ont également été colorées après décollement des larves selon le même protocole.

2.2.4 Coloration de Arnow

- Les coupes ont été déparaffinées, réhydratées, colorées et déshydratées : 2x5min Claral[®], 2x5min EtOH 100, 5min EtOH 90, 5min EtOH 70, 5min eau distillée, 30s HCl 0,5M, 1min nitrite de molybdate 10%, 1min NaOH 1M, eau distillée, 5min EtOH 90, 5min EtOH 100, 2x5min Claral[®], montage entre lame et lamelle avec résine Eukitt[®]. Des empreintes d'adhésif ont également été colorées après décollement des larves selon le même protocole.

Pour chacune des colorations, les images ont été capturées avec un microscope inversé Zeiss AxioObserver Z1 et un appareil photo Canon Eos 750D, couplés aux logiciels Zeiss AxioVision et Canon EOS utility.

2.3 Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique en transmission (MET) permet de visualiser et de décrire les structures cellulaires à l'échelle nanométrique. Un principe identique à celui de la microscopie électronique à balayage est employé sur des coupes fines (50nm). Les structures cellulaires se révèlent alors par contraste selon leur densité et leur capacité à retenir ou non les électrons. Les observations en MET ont été effectuées sur la glande principale située à la base du pied des larves pédivéligères.

- Des larves pédivéligères (n = 10) ont été nourries durant 12h par un régime unique en *Tisochrysis lutea* (1000 cellules par mL). Ceci a permis l'élimination du système digestif des diatomées *Chaetoceros sp.* dont le frustule de silice ne permet pas la réalisation de coupes ultra fines.
- Les larves ont ensuite été anesthésiées par une solution de MgCl₂ 5% pendant 30 min selon le protocole adapté de Suquet *et al.* (2009).
- Les larves ont été fixées dans une solution de glutaraldéhyde 3% dans un tampon de cacodylate de sodium 0,1M (NaCl 1,75% m/v pH 7,2) à 20 °C pendant 1h sous agitation lente.
- Les larves ont été décalcifiées dans de l'acide ascorbique 3% à 4°C pendant 12h, puis rincées 3x15min dans une solution de cacodylate de sodium 0,1M.
- Une post-fixation a été réalisée dans une solution de tétr oxyde d'osmium 1% pendant 1h sous agitation lente.
- Les échantillons ont ensuite été rincés 3x15min à l'eau milliQ et déshydratés par immersions successives dans des concentrations croissantes d'éthanol : 15min EtOH 50, 30min EtOH 70, 3x10min EtOH 90, 3x10min EtOH 100, 3x10min d'oxyde de propylène.
- Les larves ont été imprégnées en résine Epon 812. Un premier bain de 12h dans un mélange à 50% d'oxyde de propylène : résine Epon 812 (v : v) a été effectué, puis un bain de résine pure pendant 8h.
- Les larves ont ensuite été orientées dans des moules de polymérisation et placées à 60°C pendant 48h.
- Des coupes d'une épaisseur de 50 nm ont été effectuées avec un ultra microtome dans la zone de la glande principale du pied et déposées sur des grilles d'observation Cu/Rh avant séchage (12h).

- Les coupes ont été contrastées avec une solution d'acétate d'Uranyle en solution aqueuse saturée à l'obscurité durant 30min, puis rincées 50 fois par immersion rapide dans de l'eau milliQ.
- Les coupes ont ensuite été contrastées avec une solution de Reynolds (nitrate de plomb 1M, citrate de sodium 1M, soude 1M) en atmosphère saturée en NaOH durant 10min.
- Les coupes ont été rincées 50 fois par immersion rapide dans une solution de NaOH 0,02M, puis 50 fois par immersion rapide dans de l'eau milliQ, et séchées.
- Les observations ont été effectuées sur un microscope électronique à transmission JEOL 1400 à la plateforme d'imagerie et de mesures en microscopie de l'UBO.

3 Caractérisation moléculaire

3.1 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) permet d'obtenir l'empreinte moléculaire d'un échantillon. Un rayon infrarouge provoque des vibrations moléculaires au sein de l'échantillon par absorption et dissipation d'énergie. Le signal capté par le détecteur est ensuite converti en spectre par une transformée de Fourier, fournissant les empreintes spectrales des différentes structures chimiques composant l'échantillon. Afin d'évaluer la composition chimique globale de l'adhésif, une analyse FTIR a été effectuée sur l'adhésif sécrété. Les analyses FTIR ont été menées en collaboration avec le Laboratoire Détection, Capteurs et Mesures de l'Ifremer, Unité Recherche et Développement Technologiques.

- Des plaques d'acier inoxydable 316L polies, d'une surface d'un cm^2 , ont été placées dans un tamis de fixation contenant des larves pédivéligères.
- Après 48 h, les plaques ont été prélevées, rincées avec de l'eau milliQ et séchées à l'air libre.
- Les larves fixées ont été décollées des plaques à l'aide de micro-pinces, et les débris éventuels de coquille ont été méticuleusement éliminés.
- Les mesures de microscopie FTIR ont été effectuées avec un spectromètre infrarouge Thermo IS50 couplé à un microscope infrarouge Thermo Continuum avec un objectif IR 32x et un détecteur à élément unique Mercury Cadmium Telluride (MCT) refroidi à l'azote liquide. Chaque spectre a été obtenu par 65 balayages enregistrés à une résolution de 4 cm^{-1} . Les spectres obtenus ont été traités avec le logiciel OMNIC Thermo Scientific.

3.2 Analyses protéomiques

Afin de déterminer la composition protéique de l'adhésif sécrété par la larve pédivéligère de *C. gigas* plusieurs analyses protéomiques ont été menées. Des contraintes majeures sont liées à l'étude protéique de l'adhésif sécrété par les larves pédivéligères de *C. gigas* : i) la très faible quantité de bioadhésif disponible, ii) la difficulté d'isoler une fraction relativement pure de ce bioadhésif, iii) la résistance de cette matrice aux extractions protéiques classiques. Ainsi, trois approches ont été explorées : i) une analyse de l'adhésif sécrété, ii) une analyse comparative effectuée sur des larves au stade véligère (sans pied) et au stade pédivéligère (avec pied), iii) une analyse ciblée sur la glande principale du pied de la larve.

3.2.1 Analyse protéomique de l'adhésif sécrété

Des lames de microscopie en verre ont été placées dans les tamis de fixation afin de capter les larves pédivéligères. Après 24h, les lames de verre ont été retirées du tamis, rincées avec de l'eau distillée et plongées dans de l'azote liquide. Les lames ont ensuite été lyophilisées. Les larves ont été retirées des lames avec des micro-pinces. Les débris présents sur les lames (micro-algues, fèces, brisures de coquille...) ont été soigneusement éliminés.

3.2.2 Extractions protéiques

- Pour chaque extraction protéique (n = 5), les lames de verre présentant environ 1000 empreintes d'adhésif ont été broyées en azote liquide afin d'obtenir une poudre fine de verre et d'adhésif. En parallèle de chaque extraction, un témoin non broyé a subi l'extraction afin d'observer les changements morphologiques sur les empreintes.
- L'adhésif a été immergé dans une solution d'EDTA 0,1M pendant 48h à 4°C. Les tubes ont ensuite été centrifugés (5000g, 10min, 4°C) et le surnageant éliminé.
- Cinq tampons d'extraction ont été testés (Tableau 1).

Tableau 1 : Protocoles d'extraction protéique testés sur les empreintes d'adhésif de *Crassostrea gigas*.

Tampon d'extraction	Urée 8M, SDS 2%, Triton x-100 2%, CHAPS 2%, pH 4,3	NaOH 0,1M, EDTA 0,05M, SDS 2%, β -mercaptoéthanol 2%, pH 9,7	Tris-HCl 1,5M, guanidine hydrochloride 6M, EDTA 0,02M, DTT 0,5M, pH 8,5	Guanidine hydrochloride 2M, Hydroxylamine hydrochloride 2M, K_2CO_3 0,2M, pH 9	Tris-HCl 0,6M, SDS 2%, DTT 0,5M, pH 6,8
Condition d'extraction	1h, 60°C	30min, 90°C	1h, 60°C	4h, 45°C	3h, 60°C
		Ajout acide acétique 4M	Ajout iodoacétamine 0,5M 20min, β -mercaptoethanol 1,25 M	Ajout acide trifluoroacétique 2%	
Références, organisme traité	Buffet J.P., communication personnelle, Polychètes	(Von Der Haar, 2007), Levures	(Kamino <i>et al.</i> , 2000), Balanes	(Tan <i>et al.</i> , 2015), Calmar (Bec)	(Santos <i>et al.</i> , 2009), Oursins

- Les tubes ont été centrifugés (11 000g pendant 5 min, 20°C) et le surnageant récupéré.
- Un dosage de Bradford a ensuite été effectué (Bradford, 1976).
- Une fraction des extraits protéiques a été séparée sur un gel 1D SDS-PAGE : un équivalent de 10 μ g d'extrait protéique a été incubé 10 min avec un volume équivalent de tampon Laemmli supplémenté en β -mercaptoéthanol, puis déposé sur gel d'acrylamide à 4% et séparé sur un gel d'acrylamide à 12% dans un tampon de migration Tris-Glycine-SDS 1X, pH 8,8.
- La fraction restante a été concentrée sur une membrane de 3kDa (Amicon Ultra 2mL), (7500g, 2 x 30 min, 20°C).
- Un dosage de Bradford a été effectué sur le filtrat et le concentrât.

Les cinq extractions protéiques ont été menées en parallèle sur une plaque de verre non broyée ($n_{\text{empreintes}} = 10$) afin de visualiser sous loupe binoculaire la morphologie des empreintes d'adhésif après traitement.

3.2.3 Analyse directe

Une analyse directe ($n = 3$), sans extraction protéique, a également été réalisée sur les empreintes d'adhésif.

- Un cm² de verre dépoli ($n_{\text{empreintes}} = 300$) a été digéré avec 20 μ g de trypsine (Pierce Trypsin Protease MS Grade Thermo Fisher Scientific) dans 3 ml de tampon bicarbonate de triéthylammonium (BICAM) 100 mM pH 8,5 à 37° C sous agitation douce pendant 24h.
- Le surnageant a été récupéré, concentré par évaporation sous vide et conservé à -80 ° C.

- Les échantillons ont été remis en suspension dans le TFA 0,1% avant le fractionnement par nano-LC. L'étape de chromatographie a été réalisée sur un système nano-LC (Prominence, Shimadzu). Les peptides ont été concentrés sur une précolonne C18 Zorbax® 5 x 0,3 mm (Agilent) et séparés sur une colonne Zorbax 150 x 75 µm C18 (Agilent). Les phases mobiles consistaient en 0,1% d'acide trifluoroacétique, 99,9% d'eau (v : v) (A) et 0,1% d'acide trifluoroacétique dans 99,9% d'ACN (v : v) (B). La vitesse de nanoflux a été fixée à 300 nl.min⁻¹, et le profil du gradient était le suivant : constant 2% B pendant 5 min, de 2 à 5% B en 1 min, de 5 à 32% B en 144 min, de 32 à 70% B en 10 min, de 70 à 90% B en 5 min et retour à 2% B en 10 min. Le volume de 300 µl.min⁻¹ de la solution de peptide a été mélangé avec 1,2 µL.min⁻¹ de solutions de matrice CHCA 5 mg.ml⁻¹ préparées dans une solution diluée de 50% de CAN avec 0,1% de TFA. Vingt-deux fractions ont été observées avec un AccuSpot (Shimadzu) sur une cible en acier inoxydable Opti-TOF™ 384.
- La spectrométrie de masse a été réalisée sur un analyseur protéomique AB Sciex 5800 équipé d'une optique ionique TOF / TOF et d'une irradiation laser sur axe OptiBeam™ avec un taux de répétition de 1000 Hz. Le système a été calibré immédiatement avant l'analyse avec un mélange de des-Arg-Bradykinine, Angiotensine I, Glu1-Fibrinopeptide B, ACTH (18-39), ACTH (7-38) et une précision de masse supérieure à 50 ppm. Toutes les acquisitions ont été prises en mode automatique. Une intensité de laser de 3400 était typiquement utilisée pour l'ionisation. Les spectres MS ont été acquis dans le mode réflecteur positif en combinant 1000 spectres uniques (5 × 200) dans la gamme de masse de 700 à 4000 Da. Les spectres MS / MS ont été acquis dans le mode réflecteur MS / MS positif en combinant un maximum de 2500 spectres simples (10 × 250) avec une intensité laser de 4300. Pour les expériences MS en tandem, la tension d'accélération appliquée était de 1 kV et l'air était utilisé comme gaz de collision avec pression de gaz réglée sur le fluide. Le motif de fragmentation a été utilisé pour déterminer la séquence du peptide.
- La recherche dans la base de données a été réalisée à l'aide du programme Mascot 2.5.1 (Matrix Science) sur la base de données dédiée de *C. gigas* (28 028 protéines). Les modifications variables autorisées étaient les suivantes: C-carbamidométhyle, K-acétylation, oxydation de la méthionine et dioxydation. La "trypsine" a été sélectionnée et deux erreurs ont également été tolérées. La précision de la masse a été fixée à 200 ppm et à 0,6 Da pour les modes MS et MS / MS respectivement. Des séquences communes de trois répétitions ont été isolées et identifiées. L'annotation fonctionnelle a été réalisée avec le logiciel BLAST2GO 4.0.7. La recherche de domaines conservés a été effectuée avec le programme InterPro (Finn *et al.*, 2016), et une prédiction de la localisation subcellulaire a été effectuée avec le programme DeepLoc 1.0 (Almagro Armenteros *et al.*, 2017). L'expression temporelle des gènes codants

pour les protéines identifiées a été visualisée à partir des données de la Table S14 « Transcriptomic representation of gene (RPKM) at different developmental stages and in different adult organ » de Zhang *et al.* (2012).

3.2.4 Protéomique comparative aux stades véligère et pédivéligère

Une analyse protéomique a été réalisée sur des larves entières au stade véligère (J9 post-fécondation) et pédivéligère (J14 et J15 post-fécondation). L'objectif était de comparer des larves ne présentant pas de pied (J9) et des larves ayant un pied développé et fonctionnel (J14 et J15), dans le but de détecter les protéines potentiellement impliquées dans l'adhésion.

- Environ 20 000 larves véligères (J9 post-fécondation, taille moyenne 180µm) et 13 000 larves pédivéligères (J14 post-fécondation, taille moyenne 230µm et J15 post-fécondation, taille moyenne 240µm) ont été prélevées pour chaque extraction (n=3), le maximum d'eau a été retiré puis les larves ont été congelées à -80°C.
- Les larves ont ensuite été broyées avec des billes de céramique à -80°C à une vitesse de rotation de 6,5m.s⁻¹ pendant 3 cycles de 45s dans 1mL de tampon d'extraction protéique (urée 7M, Thio-urée 2M, CHAPS 4%, *Protease inhibitor* 1X).
- Les larves ont été centrifugées 15min à 10 000g à 20°C et le surnageant contenant les protéines extraites a été récupéré.
- La quantité de protéines extraite a été dosée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).
- 200µg de protéines ont été séparées sur gel 1D SDS-PAGE comme décrit précédemment.
- Le gel a ensuite été découpé en dix fractions égales pour chaque extraction.
- Les protéines ont été réduites et alkylées par immersion successive des morceaux de gel : 10min dans 500µL ACN, 30min à 56°C dans 50µL DTT 10mM BICAM 100mM, 10min 500µL ACN, 20min à l'obscurité dans 50µL IA 55mM BICAM 100mM, 10min 500µL ACN.
- Les protéines ont ensuite été digérées par de la Trypsine (Pierce Trypsin Protease MS Grade Thermo Fisher Scientific) pendant 16h à 37°C.
- Les peptides ont été extraits et purifiés sur une colonne C18 (C18 ZipTip Peptide Clean up). L'élution a été évaporée sous azote avant d'être reprise dans la phase mobile A (acide formique 0,1%) avant injection de l'échantillon en nanoLC MS-MS.
- Les peptides ont ensuite été séparés par un système nano-LC (Shimadzu Prominence) à un débit de 300 nL/min. Plus précisément, les peptides ont d'abord été chargés sur une pré-colonne (Zorbax 300SB-C18, 5 µm x 5x 0,3 mm, Agilent Technologies) puis séparés sur une colonne C18 (PepMap RSLC C18, 3µm, 100 Å, 75 µm x 15 cm, Thermo Fisher Scientific) par addition graduelle d'acétonitrile 0,1 % acide formique (2,5 % à 50 % en 140 min). Les peptides

ont ensuite été analysés à l'aide d'un spectromètre de masse (LTQ-XL-Orbitrap, Thermo Fisher Scientific), équipé avec une source NanoSpray dont le voltage était réglé à 1,8 kV et opéré en mode positif « data-dependent » par le logiciel Xcalibur (version 2.1, Thermo Fisher Scientific). Les spectres MS simple ont été acquis sur une gamme de 400 à 1500 m/z avec une résolution de 60 000. Les valeurs pour l'isolation des ions étaient les suivantes : CID (collision induced dissociation) comme type d'activation, 2 pour la charge par défaut, 1 m/z de largeur d'isolation, 35 eV pour l'énergie de collision normalisée et temps d'activation de 30 msec. Pour l'exclusion dynamique, les valeurs étaient : 1 répétition, 30 sec de durée de répétition, liste d'exclusion de 500, durée d'exclusion de 60 sec et 1,5 Da de largeur d'exclusion de masse. Les 6 ions les plus intenses étaient sélectionnés pour une fragmentation CID. Les spectres MS et MS/MS acquis ont ensuite servi à identifier les protéines.

- Les protéines ont été identifiées à l'aide de l'algorithme Sequest (Thermo Fisher Scientific) du logiciel Proteome Discoverer (version 2.2, Thermo Fisher Scientific) en utilisant une base de données spécifique de *Crassostrea gigas* (63020 protéines, téléchargé sur le site du NCBI ((National Center for Biotechnology Information, le 27/07/2018). Les paramètres utilisés pour la recherche étaient les suivants : la carbamidométhylation des cystéines, l'oxydation des méthionines et la phosphorylation des sérines, thréonines et tyrosines comme modification possible, la Trypsine (avec la possibilité de 3 coupures manqués) comme enzyme, tolérance pour la masse des peptides de 10 ppm, tolérance pour la masses des fragments de 0,6 Da. Les peptides et protéines ont été validés en calculant un « false discovery rate » (FDR < 0,01) via l'utilisation d'une base de données randomisée.

L'annotation fonctionnelle a été réalisée avec le logiciel BLAST2GO 4.0.7. Les protéines identifiées uniquement dans les échantillons J14 et J15 (non détectées en J9) ont été sélectionnées. La recherche de domaines conservés a été effectuée avec le programme InterPro (Finn *et al.*, 2016), et une prédiction de la localisation subcellulaire a été effectuée avec le programme DeepLoc 1.0 (Almagro Armenteros *et al.*, 2017). La conformation des protéines d'intérêt a été analysée par le programme Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015).

3.2.5 Protéomique de la glande

La glande principale, contenant l'adhésif, située à la base du pied des larves pédivélégères de *C. gigas* a été échantillonnée par microdissection laser. Cette technique permet d'obtenir un échantillon tissulaire homogène, permettant ainsi une extraction protéique spécifique de la glande adhésive.

- Des larves en phase de *crawling* (n = 10 000) ont été prélevées, fixées, décalcifiées et incluses en paraffine suivant le protocole préalablement décrit (§ 2.2 Histologie).

- Des coupes d'une épaisseur de 10µm ont été réalisées et placées sur des lames en polyéthylène naphthalate (PEN Membrane Slides) préalablement activées 15min sous UV. Les coupes ont été immobilisées avec une lame de microscopie classique.
- Une dissection par laser ultraviolet (UV) et capture par laser infrarouge (IR) des glandes principales ont été réalisées avec un microdissecteur Arcturus XT en collaboration avec la plateforme d'histopathologie de Rennes (H2P2). Les paramètres des lasers (puissance, fréquence, vitesse) ont été ajustés en fonction de la qualité des coupes. Une surface totale de 3,2 mm² a été prélevée sur 12 caps différents. Un témoin négatif de microdissection a été réalisé sur une lame sans échantillon.
- Une extraction protéique a ensuite été menée sur chaque cap avec le kit QProteome FFPE Tissue Kit. Les extractions de 4 caps ont été rassemblées afin de réaliser un triplicat d'analyse sur les 12 caps total.
- Les microdissections ont été déparaffinées avec 200µL d'heptane pendant 1h à température ambiante sous agitation. 40µL de méthanol ont été ajoutés et les tubes ont été centrifugés à 9000g pendant 2min.
- Le surnageant a été éliminé, et le culot contenant les microdissections a été séché pendant 5min.
- Le culot a été recouvert par 100µL de tampon d'extraction EXB Plus supplémenté en β-mercaptoéthanol. Les tubes ont été placés sur glace pendant 5min, puis incubé à 100°C pendant 20min puis 80°C durant 2h sous agitation (750rpm).
- Après centrifugation à 14000g pendant 15min à 4°C, le surnageant contenant les protéines a été récupéré et concentré par évaporation sous azote jusqu'à un volume d'environ 20µL.
- 5µL de Laemli 5X ont été ajoutés aux extraits, puis placés à 65°C pendant 10min avant dépôt sur gel 1D SDS-PAGE comme décrit précédemment.
- Une migration courte a été réalisée, et stoppée immédiatement après pénétration du front de migration dans le « running gel » afin de purifier et concentrer les protéines.
- La bande de gel contenant les protéines a été découpée. Les protéines ont été réduites et alkylées par immersion successive des morceaux de gel : 10min dans 500µL ACN, 30min à 56°C dans 50µL DTT 10mM BICAM 100mM, 10min 500µL ACN, 20min à l'obscurité dans 50µL IA 55mM BICAM 100mM, 10min 500µL ACN.
- Les protéines ont ensuite été digérées par de la Trypsine (Pierce Trypsin Protease MS Grade Thermo Fisher Scientific) pendant 16h à 37°C.
- Les peptides ont ensuite été extraits et purifiés sur une colonne C18 (C18 ZipTip Peptide Clean up). L'élution a été évaporée sous azote avant d'être reprise dans la phase mobile A (acide

formique 0,1%) avant injection de l'échantillon en nanoLC MS-MS selon le protocole décrit ci-dessus (§ 3.2.2 *Protéomique comparative*).

3.3 Hybridation *in situ* ARN : localisation de transcrits potentiellement impliqués dans l'adhésion

L'hybridation *in situ* ARN (ISH) permet de localiser au niveau tissulaire le site d'expression d'un gène cible. Une sonde nucléotidique marquée, spécifique et complémentaire de l'ARNm cible, est utilisée. Le gène codant pour une protéine identifiée lors de l'approche en protéomique a été sélectionné comme candidat d'ISH afin de localiser le site d'expression de celui-ci. Toutes les manipulations décrites ci-après ont été réalisées en conditions « RNase-free » pour éviter la dégradation des ARN. Le matériel utilisé a été traité avec du pyrocarbonate d'éthyle (DEPC) 0,1% durant 24h afin d'éliminer les RNases, puis placé à l'autoclave pour éliminer le DEPC.

3.3.1 Synthèse des sondes ARN

- L'ARN total de 1000 larves pédivéligères de *C. gigas* a été extrait avec du TRI-Reagent.
- L'ADNc total a été obtenu par *reverse* PCR avec le kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher).
- Un fragment de 596 pb de la position 162 à la position 757 de l'ADNc (XM_011428314.1 PREDICTED: *C. gigas* non caractérisé LOC105327706 (LOC105327706), ARNm) a été amplifié par PCR avec les amorces suivantes : sens TGGAGGAAAGCCTCAGGTAA / anti-sens TGAATGTCAAAGCCCCTTTC
- La synthèse de ribosondes a été réalisée comme décrit par Fabioux *et al.* (2004). Le fragment amplifié de l'ADNc a été purifié avec le kit PCR Clean up (Macherey Nagel), sous-cloné dans un plasmide pCR4-TOPO, et transformé dans la bactérie *E. coli* TOP10 avec le kit TOPO TA Cloning for sequencing (Invitrogene).
- Les plasmides ont ensuite été purifiés avec le kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey Nagel) et séquencés pour vérifier le sens d'insertion de l'ADNc d'intérêt.
- Les plasmides ont été linéarisés par les enzymes de restriction NotI ou SpeI (Promega) de part et d'autre du site d'insert, puis une transcription *in vitro* avec le kit Maxi Script T7 Transcription (Roche) a été effectuée, permettant la synthèse des sondes ARN sens et anti sens marqués à la digoxygénine (DIG) avec le kit DIG RNA Labeling Mix (Roche).
- Les sondes ont ensuite été purifiées et conservées à -80°C.

3.3.2 Vérification de la spécificité des sondes : DOT BLOT

La spécificité d'hybridation des sondes a été vérifiée par Dot Blot.

- Les sondes ont été diluées (100 à 0,01 pg/μL) dans du tampon (H₂O DEPC : SSC 20X : Formaldéhyde, 5 :3 :2), déposées sur une membrane de nylon et incubées à 100°C pendant 30min.
- La révélation a ensuite été effectuée : 5min tampon de lavage (acide maléique 0,1M, NaCl 0,15M pH 7,5, Tween-20 0,3%), 30min tampon de blocage (10% Blocking Reagent dans acide maléique 0,1M et NaCl 0,15M pH 7,5), 30min solution d'anticorps anti-DIG AP, Fab fragment (Roche Diagnostics®) dilué au 1/5000ème dans le tampon de blocage, 2x15min tampon de lavage, 5min tampon de détection (Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,1M, pH 9,5), quelques minutes dans la solution substrat NBT/BCIP (Roche Diagnostics®).

3.3.3 Hybridation *in situ* sur coupes

Le protocole d'ISH a été réalisé comme décrit dans (Bouillot *et al.*, 2017). L'ISH sur coupes histologiques a été réalisée sur des coupes sériées permettant de visualiser la même région de l'organisme avec la sonde sens et la sonde anti-sens. Une troisième coupe sériée a également subi une coloration hématoxyline/éosine permettant de visualiser les structures tissulaires.

- Des larves pédivéligères et des coupes transversales d'huîtres adultes ont été incluses en paraffine selon le protocole d'histologie décrit ci-dessus (§ 2.2 Histologie), en conditions RNase free. Afin de conserver les ARN, les larves ont été décalcifiées selon la méthode de Jackson *et al.* (2006) avec la solution suivante : PFA 4%, EDTA 350mM, PBS 1X. Des coupes histologiques d'une épaisseur de 5μm ont été placées sur lames polylysine™ (VWR).
- Les coupes ont été déparaffinées, réhydratées, rincées 2x5min dans du PBS 1X et traitées avec une solution de protéinase K 10mg.mL⁻¹ (Sigma P2308) à 37°C pendant 10min.
- Les coupes ont été rincées 2x5min dans du PBS 1X et post fixées dans une solution de PFA 4%, PBS 1X durant 7min.
- Les coupes ont été rincées : 2x5min PBS 1X, 2x5min TAE 0,1M, 0,25% anhydride acétique.
- Les coupes ont ensuite été pré-hybridées durant 1h30 à 50°C avec de l'ARNt de levure dans la solution suivante : sulfate de dextran sodium 10%, Denhardt's 1X, SSC 4X (NaCl 0,6 M, citrate de sodium 0,06M), ARNt de levures 12,5 μg.mL⁻¹, ADN de sperme de saumon 12,5 μg.mL⁻¹, EDTA 0,5 M, formamide 50% v/v.
- Les sondes sens et anti-sens ont été dénaturées 5min à 80°C, puis diluées dans du tampon d'hybridation à une concentration de 400pg.μL⁻¹.
- Les coupes préalablement préparées avec une fenêtre d'hybridation ont été hybridées durant 16h à 55°C.

- Après lavages (5min SSC 2X, 15min SSC 2X à 37°C sous agitation, 15min SSC 1X à 37°C sous agitation, 2x15min SSC 2X avec 50% formamide à 45°C sous agitation, 7min solution saline sous agitation), les coupes ont été incubées 30 min dans une solution de blocage.
- La révélation a été effectuée avec le kit DIG Nuclis acid detection (Roche). Les coupes ont été incubées 2h dans une solution d'anticorps antiDIG à une concentration de 375mU.mL⁻¹ dans du tampon de blocage.
- La coloration a ensuite été effectuée à 35°C à l'obscurité dans du tampon de détection (375 µg.mL⁻¹ de NBT, 188 µg.mL⁻¹ de BCIP et 240 µg.mL⁻¹ de lévamisole).
- Après apparition de la coloration, la réaction de détection a été stoppée avec une solution de tampon TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM).
- Une contre-coloration avec une solution de brun de Bismarck 0,3% a été effectuée.
- Les coupes ont ensuite été déshydratées et montées sous lamelle avec du baume du Canada.

3.3.4 Hybridation *in situ* whole mount

- L'ISH a également été effectuée en « whole mount » (WISH), sur des larves entières selon le protocole décrit par Nederbragt *et al.* (2002).
- Des larves pédivéligères (n=100) ont été fixées dans une solution de MEMPFA-T (MOPS 0,1M pH 7,4, EGTA 2mM, MgSO₄ 1mM, PFA 4%, Tween-20 0,1%) pendant 1h.
- Les larves ont ensuite été décalcifiées dans une solution de d'EDTA 350mM, PFA 4%, PBS 1X, pendant 1h (Jackson *et al.*, 2006).
- Les larves ont été déshydratées dans des bains de méthanol/TBS-T (NaCl 136mM, Tris 25mM pH 7,4, KCl 2,7mM, Tween-20 0,1%) : 5min 25/75, 5min 50/50, 5min 75/25, 15min méthanol pur, conservées à -20°C.
- Les larves ont été réhydratées dans des bains par le protocole inverse de la déshydratation.
- Les larves ont été perméabilisées dans une solution de protéinase K (50ng.mL⁻¹) dans du TBS-T pendant 20min à 37°C.
- Les larves ont ensuite été immergées 5min dans du TAE 0,1M pH 7-8, 5min dans du TAE 0,1M + 2,5 µl acide acétique anhydride/ml, 5min dans du TAE 0,1M + 5 µl acide acétique anhydride /ml
- Les échantillons ont été rincés 2x5min dans du TBST-T, puis refixés 20min dans du MEMPFA-T, puis rincés 5x5min dans du TBS-T.
- Les larves ont été préhybridées : 10min dans 500 µl 50% TBS-T / 50% de tampon d'hybridation, 6h à 65°C dans 250 µl de tampon d'hybridation.
- Les larves ont ensuite été hybridées avec 500ng.mL⁻¹ de sondes (sens ou anti-sens) pendant 16h à 65°C.

- Les échantillons ont ensuite été rincés : 20min à 65°C dans 50% de tampon d'hybridation/ 50% SSC 2X, 20min à 65°C dans 25% de tampon d'hybridation/ 75% SSC 2X, 30min à 65°C dans SSC 2X, 2x30min à 65°C dans SSC 0,2X / 0.3 % CHAPS, 2x10min dans du MaNaT, 10min dans du tampon de blocage.
- L'hybridation a ensuite été révélée : les larves ont été placées 1h dans une solution fraîche de tampon de blocage contenant une solution diluée au 1:5000 d'anti-DIG couplé à la PA (Roche). Les larves ont ensuite été rincées 2x5min, puis 6x15min dans du MaNaT et 6x15min avant un lavage dans du tampon PA.
- La coloration à 35°C à l'obscurité a été réalisée dans la solution suivante : Tampon PA, polyvinyl alcohol (PVA, 100kDa) 10 % w/v, 20 μ l.ml⁻¹ de solution contenant 18,75 mg.ml⁻¹ NBT et 9,4 mg.ml⁻¹ BCIP.
- La réaction a été stoppée avec un bain de TBTS-T.
- Les larves ont été fixées 20 min dans du MEMPFA-T, puis rincées 2 fois dans du TBS-T.
- Les images ont été capturées avec un microscope inversé Zeiss AxioObserver Z1 et un appareil photo Canon Eos 750D.

4 Analyses de données transcriptomiques du génome de l'huître *C. gigas*.

Les données supplémentaires disponibles dans la publication du génome de *C. gigas* par Zhang *et al.* en 2012 présentent l'expression des gènes au cours du développement larvaire et dans différents organes adultes : Table S14 « *Transcriptomic representation of gene (RPKM) at different developmental stages and in different adult organ* ». Ces données permettent de visualiser le taux d'expression des séquences génomiques au cours du temps, en fonction des stades de développement. Les stades sont définis par le nombre de jours post-fécondation de la cohorte larvaire. Ainsi, P1 et P2 sont définis comme le stade pédivéligère à 18 jours post-fécondation. Chez la larve de *C. gigas*, l'apparition du pied est spécifique au stade pédivéligère. Cet organe a un rôle locomoteur, sensitif, et sécréteur lors de la phase d'adhésion. Il apparaît seulement quelques jours avant l'adhésion et disparaît dans les heures après. Dans le but d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans l'adhésion, les séquences présentant une RPKM « fort » aux stades P1 et P2 vis-à-vis des autres stades ont été sélectionnées selon le seuil suivant :

- RPKM des stades compris de E à U6, des stades S, et J, et des organes adultes inférieurs à 20% de P1 ou P2.
- RPKM des stades LU1, LU2 (« *Late Umbo 1 et 2* ») inférieurs à 70% de P1 ou P2.

Les séquences protéiques correspondant aux séquences génomiques sélectionnées ont ensuite été recherchées sur la base de données du NCBI, afin d'éliminer les séquences non disponibles dans les bases de données. L'annotation fonctionnelle a été réalisée avec le logiciel BLAST2GO 4.0.7. La recherche de domaines conservés a été effectuée avec le programme InterPro (Finn *et al.*, 2016), et une prédiction de la localisation subcellulaire a été effectuée avec le programme DeepLoc 1.0 (Almagro Armenteros *et al.*, 2017).

CHAPITRE III

Sécrétion de l'adhésif par le pied de la larve pédivéligère de *Crassostrea gigas*

1 Introduction

Des travaux menés sur les larves pédivéligères de bivalves tels que l'huître plate *Ostrea edulis* (Cranfield, 1973a, 1973b, 1973c, 1974, 1975), l'huître américaine *Crassostrea virginica* (Elston, 1980; Nelson, 1924; Prytherch, 1934; Tibabuzo Perdomo *et al.*, 2018), la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (Gruffydd *et al.*, 1975), et la moule bleue *Mytilus edulis* (Lane and Nott, 1975) permettent de comparer la morphologie des larves pédivéligères entre ces différentes espèces. Ces études ont été publiées pour la majorité d'entre elles dans les années 1970. Elles constituent une base de connaissance essentielle pour aborder des travaux similaires chez *C. gigas*. Le pied des larves pédivéligères est un organe clef de l'adhésion, il permet la locomotion, la détection d'un substrat adapté par des cellules sensibles, et la sécrétion de l'adhésif qui fixera la larve en vue de la métamorphose. Les similitudes morphologiques rapportées entre les larves pédivéligères de différents mollusques bivalves, ainsi que la proximité phylogénétique entre *C. gigas*, *O. edulis* et *C. virginica* laissent présager que la larve pédivéligère de *C. gigas* soit similaire à celle de ces deux espèces, tout comme sa stratégie d'adhésion. Il est donc probable que des homologies morphologiques et de composition dans l'adhésif sécrété soient observées entre la larve pédivéligère de *C. gigas* et les autres espèces étudiées.

L'objectif premier de ce chapitre est de fournir une description morphologique de la structure du pied de la larve pédivéligère de *C. gigas* et de l'adhésif sécrété à ce stade, afin de pouvoir identifier les homologies et différences présentes chez cette espèce vis-à-vis des autres espèces décrites. Chez la larve de *C. gigas*, le stade pédivéligère est atteint après 13 à 15 jours post-fécondation en conditions contrôlées. Ce temps de développement est dépendant des conditions environnementales (température, alimentation), et peut être allongé en milieu naturel (Bayne, 2017). Dans un premier temps, des observations de larves de *C. gigas* en microscopie électronique à balayage ont été réalisées afin de décrire précisément la morphologie générale du pied et de l'adhésif sécrété, depuis la larve entière jusqu'à l'échelle nanométrique. Ce travail a été complété par des coupes et colorations histologiques dans le but de visualiser les structures tissulaires de la larve. Des observations en microscopie électronique en transmission de la glande principale du pied ont également été effectuées. Ces approches visent à préciser les similitudes de structures avec les espèces précédemment citées, et à proposer une chronologie de sécrétion de l'adhésif à partir des différentes glandes présentes dans le pied.

Le second objectif de ce chapitre est de définir la composition globale de l'adhésif sécrété par la larve de *C. gigas*. Des colorations histologiques sur des coupes de larves pédivéligères ont donc été comparées aux descriptions déjà effectuées chez *O. edulis*, précisant la nature du contenu présent

dans les différentes glandes du pied des larves. L’empreinte moléculaire de l’adhésif de *C. gigas* a été obtenue par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et la composition atomique de l’adhésif a également été déterminée par spectrométrie à dispersion d’énergie à rayons X (EDS). Les travaux de ce chapitre portant sur la description de la structure du pied de la larve pédivéligère de *Crassostrea gigas* ont été publiés en 2018 (Foulon *et al.*, 2018) (annexe 1).

2 Résultats

2.1 Le pied, organe actif de l’adhésion de la larve de *C. gigas*

Les larves pédivéligères de *C. gigas* observées en microscopie optique, et placées dans un milieu non turbulent, stoppent rapidement la nage pour couler et atteindre le substrat. Elles débutent alors l’exploration de celui-ci grâce à leur pied. Cet organe, par adhésion réversible et contractions musculaires leur permet de ramper : c’est le « *crawling* ». Ce comportement indique que la larve est apte à se fixer. Le temps entre l’arrêt de la nage et la fixation définitive est variable selon les individus, de quelques minutes à plusieurs heures. Au début du *crawling*, si le substrat ne convient pas, la larve a la capacité de recommencer à nager avant d’explorer à nouveau le substrat. Lors des premières minutes de *crawling*, la larve parcourt le substrat rapidement, le pied est étendu dans la direction de progression de la larve, et les cils sont très actifs. Ensuite, l’extrémité du pied s’attache au substrat de manière réversible, des contractions musculaires permettent alors à la larve de progresser par à-coups. Au cours du *crawling*, la zone explorée est de plus en plus restreinte, la larve enchaînant les changements de directions. A la fin de la phase de *crawling*, la larve effectue uniquement des changements de direction, générant un parcours en forme d’étoile (Figure 16). La larve se place enfin sur la valve gauche et le pied change ensuite de morphologie. Celui-ci s’étale devant la larve (Figure 16– 1 :28). Les glandes principales contenant l’adhésif, localisées à la base du pied (Figure 16– flèche) se vident dans une contraction finale du pied, fixant définitivement la larve au substrat (Figure 16– 2 :02). Le pied se rétracte ensuite entre les deux valves en quelques minutes.

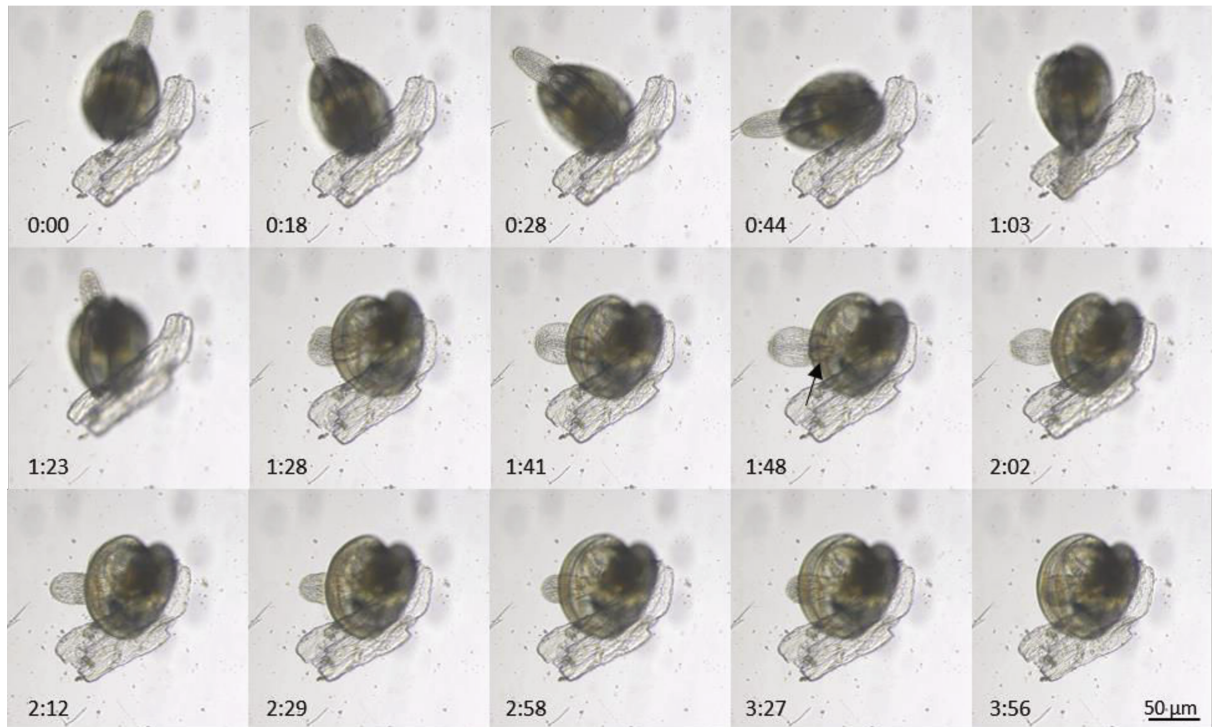


Figure 16 : Observation temporelle (mm:ss) de l'adhésion d'une larve pédivéligère de *Crassostrea gigas*. Entre 00:00 et 1:23 la larve est dans la dernière phase de *crawling* avant l'étalement du pied entre 1:28 et 1:48. A 2:02, l'adhésif est libéré, la glande principale située à la base du pied visible auparavant est vide. Entre 2:12 et 3:56 le pied se rétracte entre les deux valves. Flèche : glande adhésive principale du pied. Vidéo disponible dans le lien suivant : https://youtu.be/xU_tZqoX8lc

2.2 Morphologie du pied de la larve de *C. gigas*

Afin de permettre une orientation aisée des différentes observations morphologiques, la Figure 17 présente les différents plans anatomiques de la larve pédivéligère de *C. gigas*. Le pied, localisé dans la partie antérieure de la larve pédivéligère, a été observé en microscopie électronique à balayage (Figure 18).

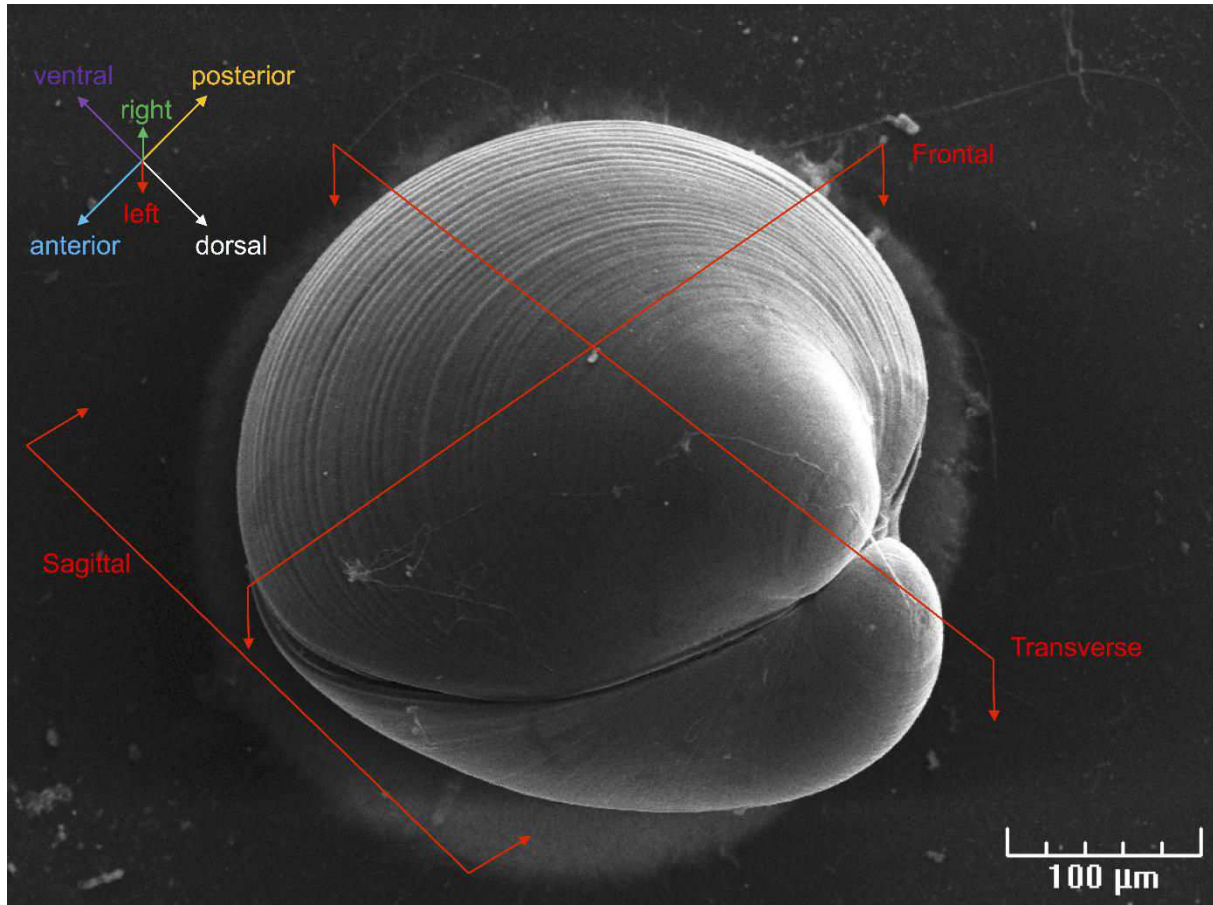


Figure 17 : Observation en microscopie électronique à balayage d'une larve pédivéligère de *Crassostrea gigas* adhérente. L'orientation tridimensionnelle de la larve, ainsi que les plans de section sont indiqués (Foulon *et al.*, 2018).

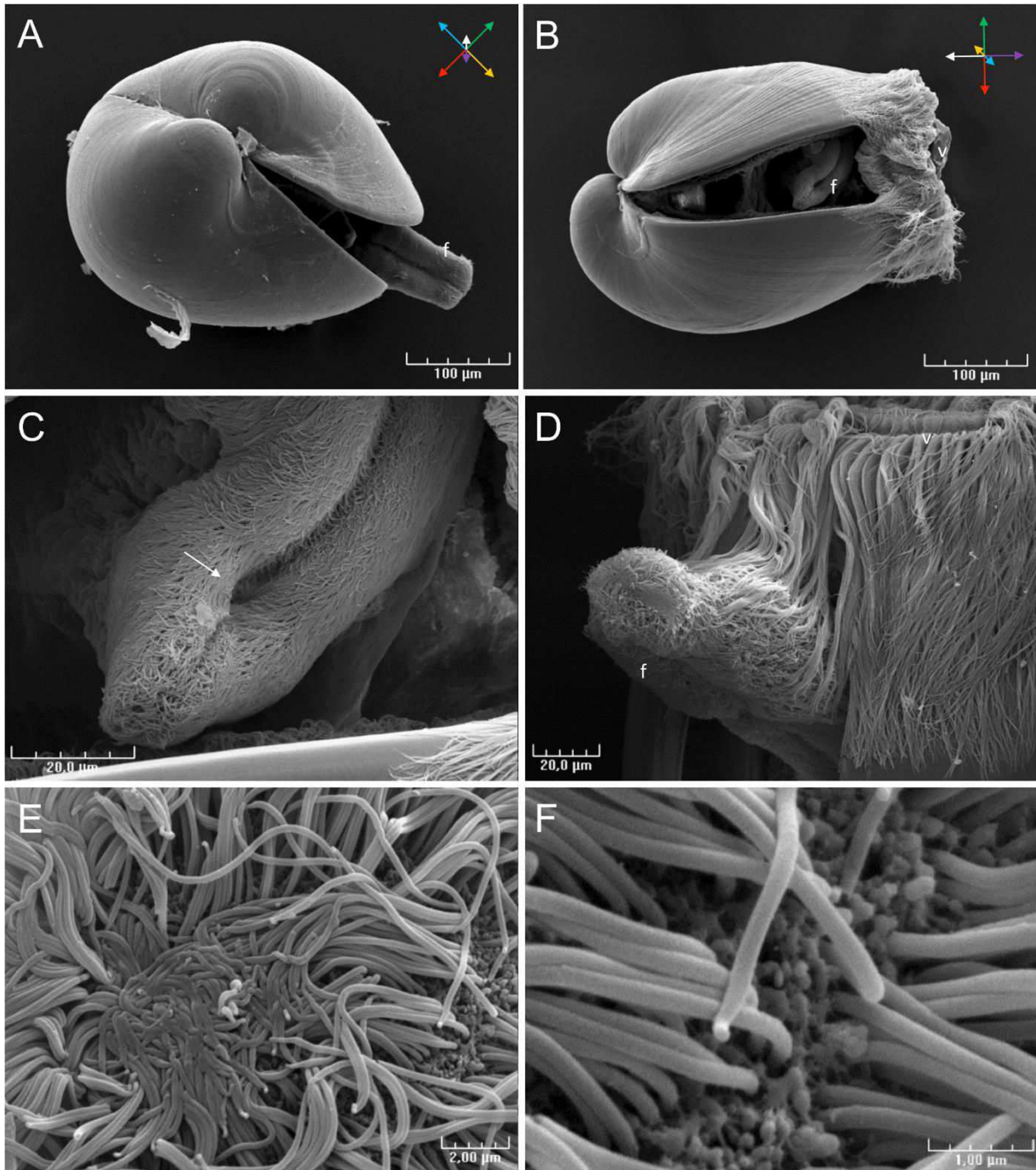


Figure 18 : Larve pédivéligère de *Crassostrea gigas* prélevée en phase de *crawling* puis observée en microscopie électronique à balayage. A : Vue dorsale, le pied est étendu. B : Vue postérieure, le pied est rétracté derrière le velum. C : Le canal byssal (flèche) est localisé à la base du talon du pied. D, E : Observation de la pointe du pied de larves prélevées en *crawling*, les cils présents au bout du pied sont écrasés. F : Des vésicules sont observées à la surface de l'épithélium de la pointe du pied, à la base des cils. f: pied, v: velum (Foulon *et al.*, 2018).

Lorsque la larve est prête à l'adhésion, le pied est étendu à l'extérieur des valves (Figure 18 A) et peut être rétracté derrière le velum chez les larves pédivéligères encore en nage (Figure 18B). Sa taille est d'environ 140 μm de long pour 40 μm de large. Il présente une symétrie bilatérale longitudinale avec un sillon central sur sa face antérieure (Figure 18 A-C). Le sillon s'étend de l'extrémité du pied jusqu'au talon du pied, un renflement à la base duquel est visible un orifice où débouche le canal byssal (Figure

18 C). Un épithélium cilié recouvre le pied de son extrémité au talon, aucun cil n'est observé à la base du pied derrière le talon (Figure 18 C, D). Les larves prélevées lors de la phase de *crawling* présentent à l'extrémité du pied un écrasement des cils (Figure 18 D, E). A la base des cils, de nombreuses vésicules de 50 à 150 nm sont observées à la surface de l'épiderme (Figure 18 F).

2.3 Le pied, un réseau complexe de glandes d'adhésifs

Une description anatomique des larves pédivéligères (Figure 19 A-C) et plus spécifiquement du pied (Figure 19 D-G) a été obtenue à partir de coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine (HE). Les trois plans anatomiques de section sont présentés sur la Figure 19 : une coupe transversale (Figure 19 A) permettant d'observer la symétrie bilatérale longitudinale, une coupe frontale (Figure 19 B) et une coupe sagittale (Figure 19 C). Le manteau (m), observé sur les trois plans de coupe, sécrète le periostracum (p) à partir du sillon périostracal. Le periostracum est une matrice organique protectrice et structurelle de la coquille, persistant après la décalcification. Le velum (v), déployé sur la Figure 19 A et rétracté sur la Figure 19 C, est un organe cilié utilisé par les larves pour nager et capter les particules nutritives. Les particules sélectionnées sont ensuite ingérées par la bouche (mo), un orifice cilié, relié à la cavité viscérale (vc) par l'œsophage (o) (Figure 19 C). Les muscles adducteurs (postérieur et antérieur), localisés de part et d'autre de la cavité viscérale (Figure 19 C), relient les deux valves de la coquille (Figure 19 A). La base du pied est entourée des rudiments branchiaux (Figure 19 A) et est liée au muscle adducteur postérieur (Figure 19 B-C). Les sections transversales sériées du pied ont été réalisées depuis le talon jusqu'à l'extrémité (Figure 19 D-G). Les principales structures du pied observées sont : (1) un épithélium cilié (Figure 19 C, F, G), (2) une structure nerveuse circulaire d'environ 20µm de diamètre située dans la partie antérieure du pied, correspondant aux ganglions pédieux (pg) (Figure 19 E, F), (3) des fibres musculaires, observées autour des ganglions pédieux et progressant le long du pied (Figure 19 D, E), (4) du tissu conjonctif et (5) la glande adhésive principale du pied (fg) (Figure 19 A- E). Cette glande, localisée à la base du pied, contient des granules polygonaux fortement éosinophiles (en rose) d'une taille de 2 à 4 µm (Figure 19 A-E). Elle occupe l'ensemble de la largeur du pied en section frontale. Les sections transversales montrent qu'elle se divise en deux parties qui se rejoignent au niveau du canal byssal (Figure 19 E), comme observable sur la Figure 16. Des cellules massives présentant une coloration violette, d'une taille d'environ 13 µm, sont localisées à la base de cette glande entre le pied et la cavité viscérale (Figure 19 C - flèche).

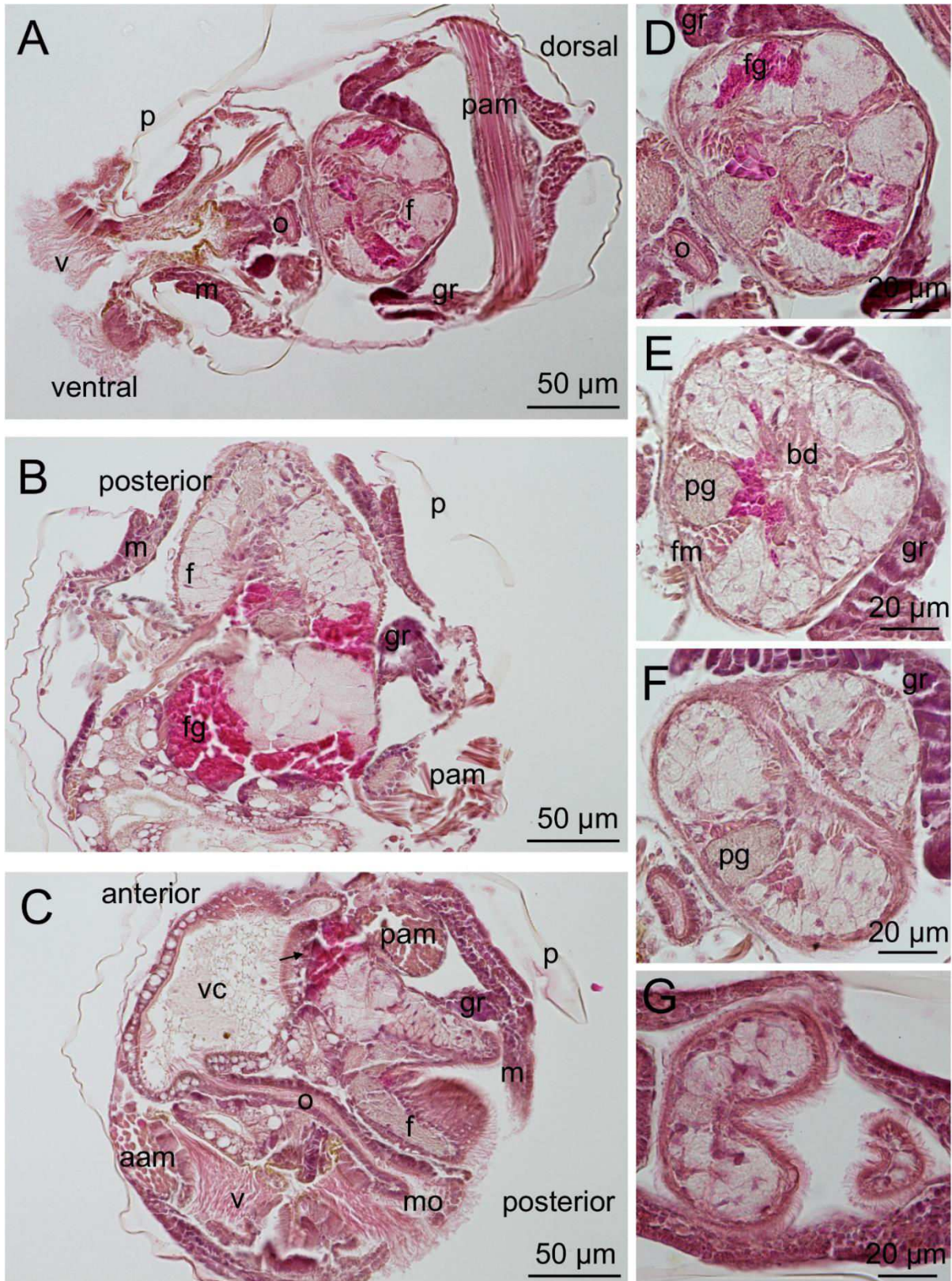


Figure 19 : Coloration hématoxyline – éosine de coupes histologiques de larves pédivéligères de *Crassostrea gigas*. A : Section transversale, B : Section frontale, C : Section sagittale de larve. D, E, F et G montrent des sections transversales sériées du pied. aam : muscle adducteur antérieur, bd : canal byssal, f : pied, fg : glande principale du pied, fm : muscles pédieux, gr : rudiments branchiaux, m : manteau, mo : bouche, o : œsophage, p : periostracum, pam : muscle adducteur postérieur, pg : ganglions pédieux, v : velum, vc : cavité viscérale, flèche (C) : cellules sécrétrices de la glande principale du pied.

Une coloration tétrachrome, permettant de colorer les noyaux en gris pourpre (hématoxyline ferrique de Weigert) les polysaccharides acides riches en groupements électronégatifs en bleu clair (Bleu d'Alcian), les polysaccharides neutres et glycoprotéines en bleu foncé à violet rouge (PAS) et les structures riches en protéines en jaune (acide picrique), révèle l'importante complexité du pied tant sur le plan biochimique, qu'en terme de structures présentes (Figure 20) : le pied comportant d'autres glandes que la glande principale déjà révélée par la coloration HE. Six glandes peuvent être distinguées par cette coloration :

- Glande A

Sur la Figure 20 A, la coupe longitudinale du pied permet d'observer une rangée de cellules présentant une coloration bleu turquoise réparties au niveau de l'épithélium de la face de sillon byssal du pied. Ces cellules sont parsemées au sein de l'épithélium, depuis le talon du pied (Figure 20 A, B), jusqu'à son extrémité (Figure 20 C). La coloration positive au bleu d'Alcian de ces cellules indique un contenu riche en polysaccharides acides.

- Glande B

Des cellules présentant une coloration mauve, indiquant un contenu riche en polysaccharides neutres et/ou glycoprotéines, sont présentes au sein du pied, au-dessus des glandes A (Figure 20 A). Ces cellules parcourent le pied sur sa longueur, des ganglions pédieux, jusqu'à l'extrémité du pied où elles semblent déboucher sur une rangée de 3 à 4 cellules (Figure 20 C).

- Glande principale / Glande C

La glande principale du pied, caractérisée par une accumulation de granules fortement éosinophiles en coloration HE (Figure 19), réagit positivement en jaune à la coloration à l'acide picrique indiquant une composition majoritairement protéique (Figure 20 A).

- Glandes D

Le canal byssal des larves pédivéligère de *C. gigas* est entouré de trois types cellulaires, nommées glandes D :

- Accolées à la glande C sur la Figure 20 A, des cellules massives, riches en polysaccharides acides (coloration bleue) sont observées. Ces cellules d'une taille d'environ 20µm par 5µm semblent déboucher directement dans le canal byssal.
- D'autres cellules présentant la même morphologie sont présentes de part et d'autre du canal byssal sur la Figure 20 A. Ces cellules sont colorées en mauve avec un

pourtour bleu foncé. Elles sont également visibles sur la coupe transversale du pied sur la Figure 20 B, débouchant également dans le canal byssal.

- Enfin, de petites cellules (1 à 2µm de diamètre) sont observées sur la partie inférieure du canal byssal, entre celui-ci et le talon du pied (Figure 20 A). Ces cellules présentent une coloration bleu foncé indiquant un contenu riche en polysaccharides.

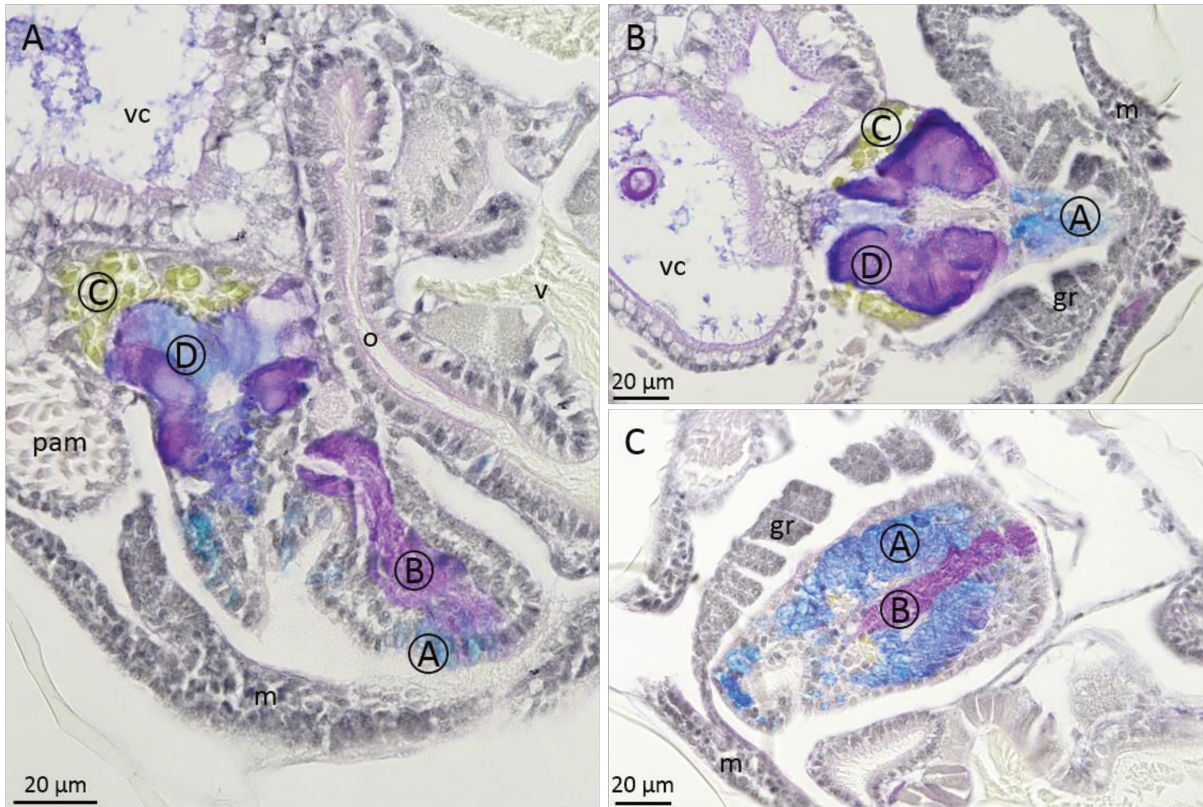


Figure 20 : Coloration tétrachrome (Bleu Alcian, PAS, acide picrique, hématoxyline de Weigert) de coupes histologiques de larves pédivéligères de *Crassostrea gigas*. A : coupe longitudinale du pied. B : coupe transversale du pied. C : coupe sagittale de la partie apicale du pied. gr : rudiments branchiaux, m : manteau, o : œsophage, pam : muscle adducteur postérieur, vc : cavité viscérale. Les glandes identifiées sont annotées par les lettres entourées (A, B, C et D).

Les colorations au notro-bleu de tétrazolium et de Arnow, permettant la détection de groupements oxydo-réducteurs et de groupements catéchols n'ont pas été positives sur les coupes de larves pédivéligères.

Les observations en microscopie électronique en transmission de coupes transversales effectuées à la base du pied permettent de visualiser les structures cellulaires de la glande C. Des cellules sécrétrices massives, autour de vésicules de sécrétion (Figure 21 A, B), très riches en réticulum endoplasmique et présentant des vésicules de Golgi (Figure 21 C-E) sont observées. Les cellules présentent des vésicules de sécrétion immatures (Figure 21 A, B, C), d'une taille d'environ 1,5 µm de diamètre, caractérisées par un contenu moins dense que les vésicules de sécrétion matures d'un diamètre de 4 à 5 µm (Figure

21 D, E). Les vésicules de sécrétion matures sont localisées au centre de la glande, contrairement aux vésicules de sécrétion immatures localisées en périphérie (Figure 21 A, B, C). Au sein des vésicules, l'adhésif est stocké au centre d'un important réseau de structures tubulaires pouvant être des *cisternae* du réticulum endoplasmique (Figure 21 D, E) observé en coupe transversale sur la Figure 21 F.

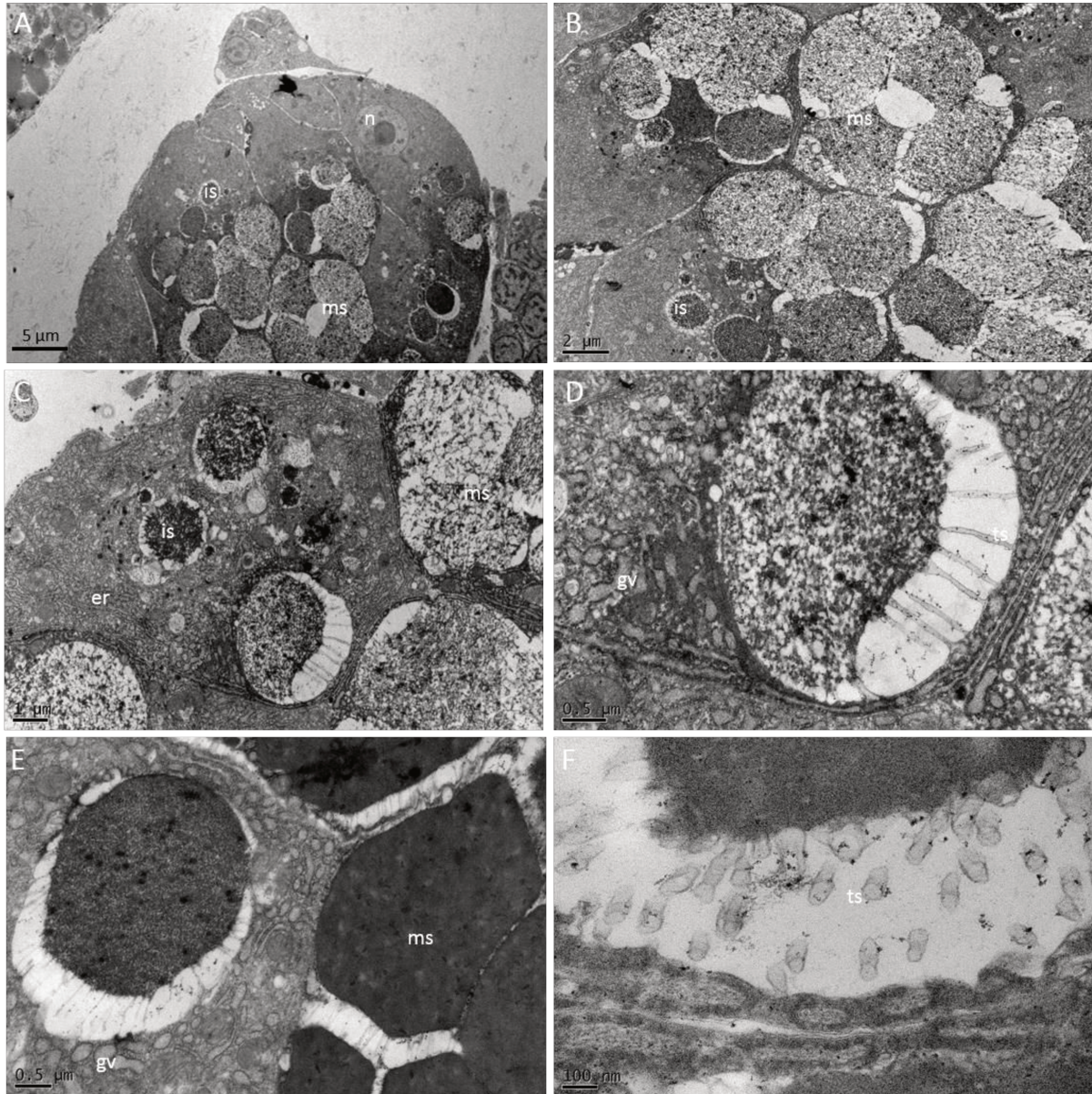


Figure 21 : Observations en microscopie électronique en transmission de coupe transversale du pied de larve pédivéligère de *Crassostrea gigas* dans la zone de la glande C. A : Vue générale de la moitié du pied. B, C : Zone centrale de la glande C montrant les vésicules de sécrétion contenant l'adhésif. D, E, F : vésicule de sécrétion immature, observation de structures tubulaires autour de la masse centrale protéique. n : noyau des cellules sécrétrices, is : vésicule de sécrétion immature, ms : vésicules de sécrétion mature, er : réticulum endoplasmique, gv : vésicules de Golgi, ts : structure tubulaire.

2.4 L'adhésif sécrété : une matrice protéique fibreuse

2.4.1 Structure de l'adhésif

L'observation en microscopie électronique à balayage de l'adhésif sécrété par la larve de *C. gigas* révèle une structure fibreuse, formant un joint parfait entre la larve et son substrat (Figure 22 A). Deux zones majeures peuvent être distinguées : une zone externe (oz), composée d'un maillage serré avec des fibres d'un diamètre moyen de 300 nm, une zone interne (iz), composée d'un réseau de fibres plus lâches, orientées verticalement, d'un diamètre plus important (500nm). Dans la zone externe, près de la coquille, les fibres convergent pour former une matrice moins fibreuse en contact direct avec la coquille (Figure 22 D). Autour des empreintes d'adhésif, des filaments d'un diamètre de 1 à 2 μ m ont été observés (Figure 22 F). Le long de ces filaments, des nanostructures joignent celui-ci au substrat, permettant probablement la liaison (Figure 22 F, G).

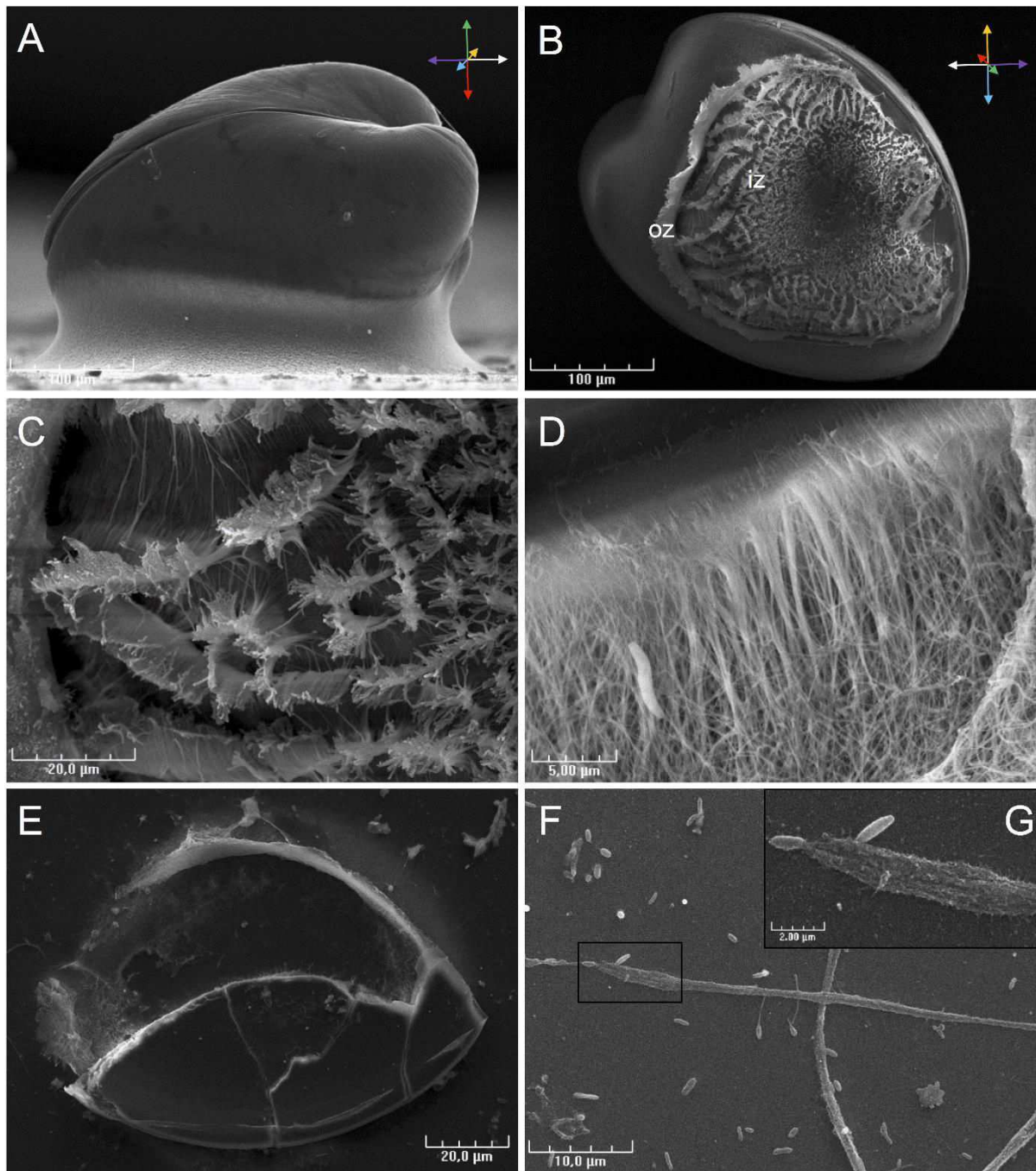


Figure 22 : Observations en microscopie électronique à balayage de l'adhésif sécrété par la larve pédiveligère de *Crassostrea gigas*. A : Vue latérale d'une larve ayant adhéré, montrant le joint d'adhésif entre la valve gauche de la larve et le substrat. B : Larve décollée et retournée permettant de visualiser la structure de l'adhésif. Deux types de fibres sont observés, composant la zone externe (oz) et la zone interne (iz). C : Dans la zone interne, la forme du réseau de fibre est commune à la rugosité du substrat. D : Les fibres de la zone externe en contact avec la coquille (en haut) s'épaississent et convergent en une substance homogène à la limite du manteau. Des bactéries sont observées, adhérentes sur les fibres de la zone externe. E : Empreinte d'adhésif. F : Des filaments de byssus sont observés autour des larves adhérentes. G : Un grossissement plus important indique la présence de microfibrilles maintenant les filaments sur le substrat (Foulon *et al.*, 2018).

2.4.2 Composition moléculaire globale de l'adhésif

La coloration tétrachrome des empreintes d'adhésif indique une composition très majoritairement protéique (Figure 23 A) et la présence de groupement oxydo-réducteurs a été révélée par la coloration au nitro-bleu de tétrazolium (Figure 23 B). La méthode de Arnow (1937) n'a pas montré la présence de catéchol au sein de l'adhésif.

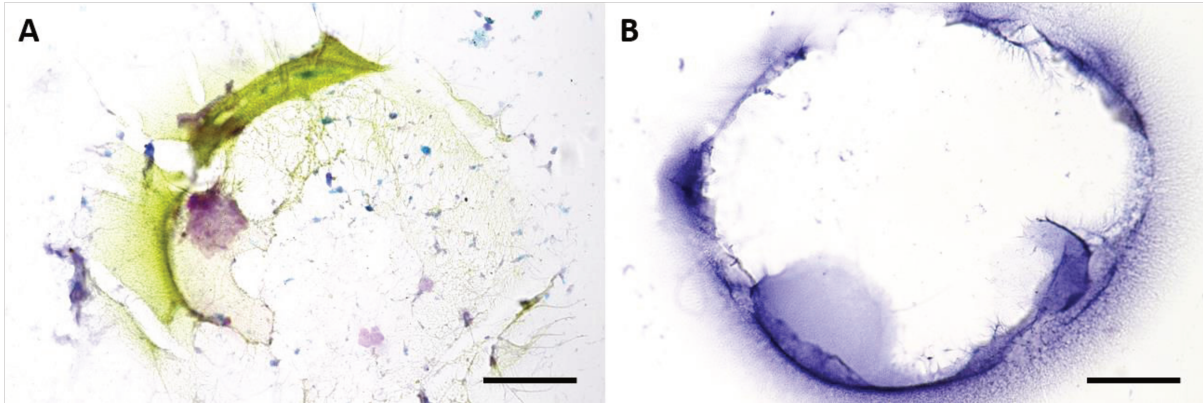


Figure 23 : A) Coloration tétrachrome (Bleu Alcian, PAS, acide picrique, hématoxyline de Weigert) et B) coloration au nitro-bleu de tétrazolium des empreintes d'adhésif de *Crassostrea gigas*. Barre d'échelle : 100µm.

La spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDS), réalisée lors des observations en MEB, a permis de déterminer la composition élémentaire de l'adhésif (Figure 24). Le spectre révèle la présence de carbone, d'oxygène, de fer, de cuivre, de sodium, de magnésium, d'aluminium, de silicium, de phosphore, de soufre, de chlorure, de potassium, et de calcium (Figure 24 A). Lors de la cartographie spatiale de ces éléments, le fer, le cuivre, le magnésium, l'aluminium et le phosphore n'ont pas été précisément localisés. Le silicium a été détecté en petits spots dans l'adhésif, résultant potentiellement de débris de diatomées. Le chlore, le sodium et le potassium sont co-localisés en agrégats dans l'adhésif (Figure 24 C-E). La cartographie spatiale EDS a également permis de localiser de l'azote, non annoté sur le spectre du fait de sa détection entre les pics du carbone et de l'oxygène. Le soufre est également spécifiquement présent au niveau de l'adhésif (Figure 24 B).

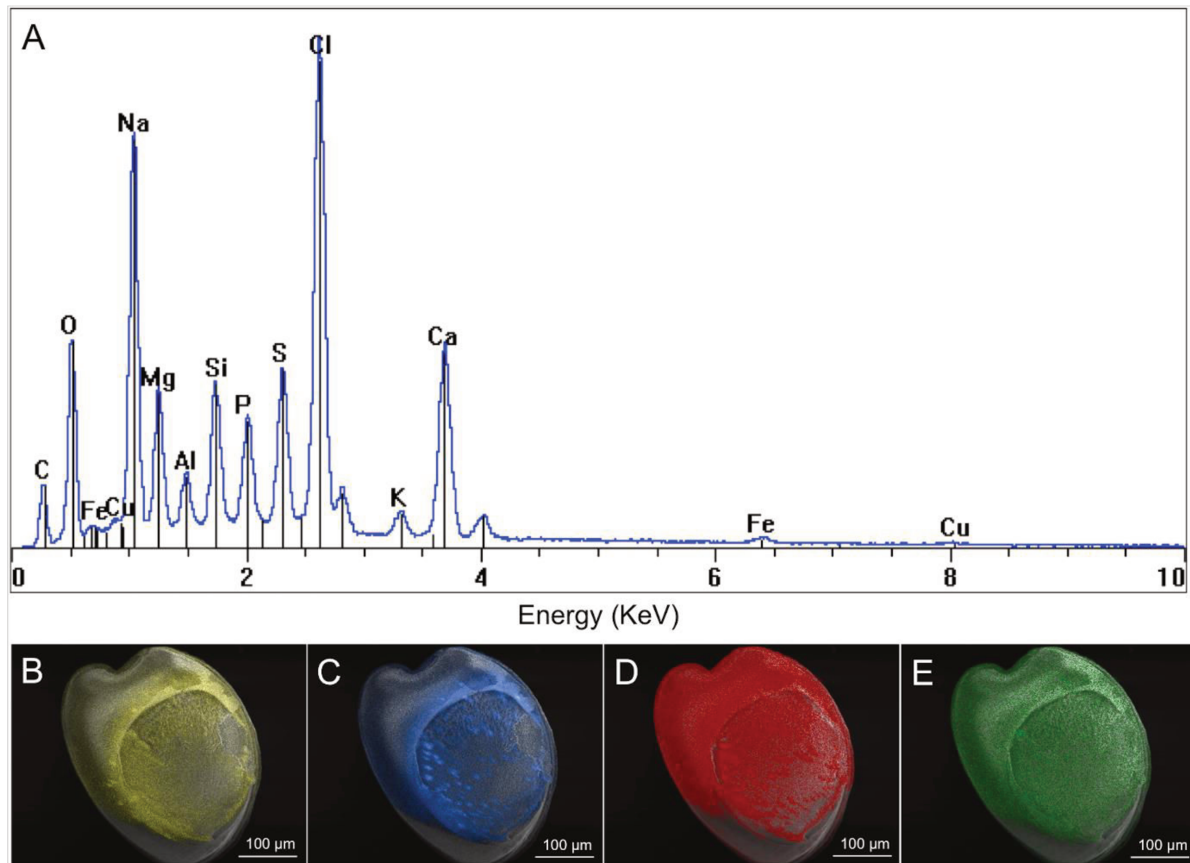


Figure 24 : Spectre d'énergie de diffraction de X de l'adhésif sécrété par la larve pédivéligère de *Crassostrea gigas*. B-E : cartographie du soufre (B), chlore (C), sodium (D), et potassium (E) d'une larve décollée et retournée (Foulon *et al.*, 2018).

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) réalisée sur des empreintes d'adhésif a révélé un signal protéique clair avec des bandes dominantes correspondant aux groupements amide I et II à 1650 et 1550 cm^{-1} (Figure 25). Le pic à 3290 cm^{-1} correspond au groupement amide N-H et / ou aux liaisons C=O. Les pics entre 1000 - 1150 cm^{-1} indiquent la présence de polysaccharides. Des polysaccharides sulfatés sont probablement présents avec un groupement de pics dans la région comprise entre 1240 et 1245 cm^{-1} . Les pics entre 900 et 1200 cm^{-1} peuvent également être attribués à des protéines phosphorylées. Le pic observé à 2925 cm^{-1} est attribué aux liaisons C-H.

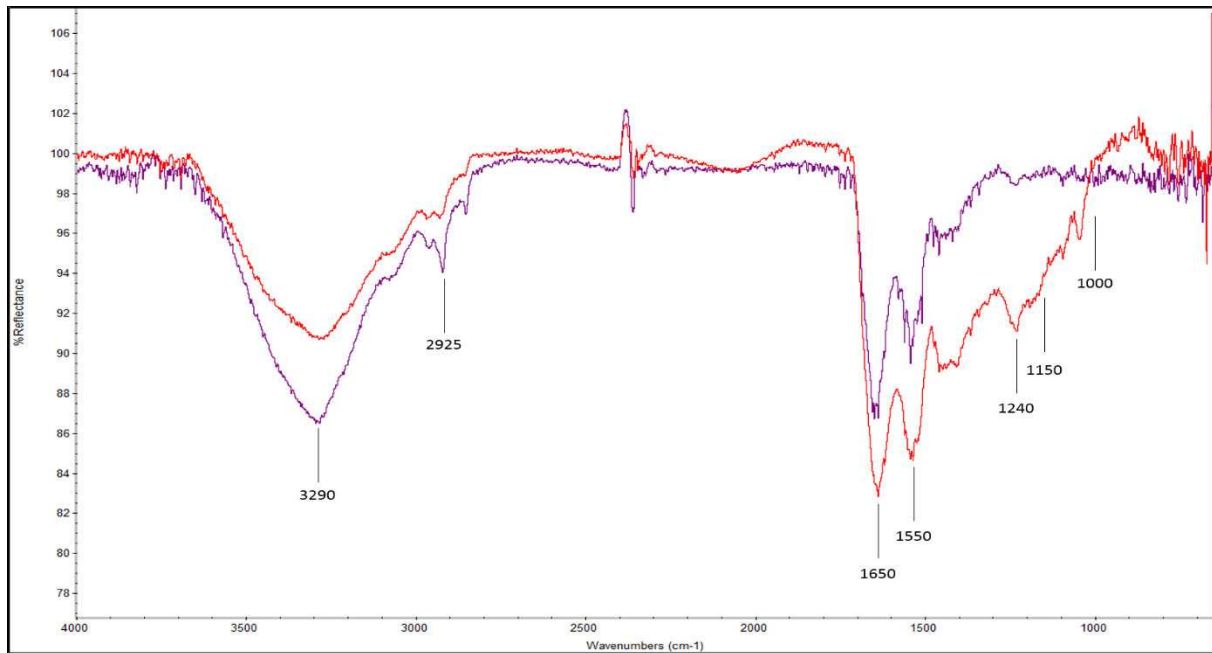


Figure 25 : Spectre FTIR de l'adhésif sécrété par la larve pédivéligère de *Crassostrea gigas*. Rouge : spectre de la zone interne de l'adhésif. Bleu : spectre de la zone externe de l'adhésif (Foulon *et al.*, 2018).

3 Discussion

3.1 Morphologie du pied et rôle lors du *crawling*

Les observations réalisées sur le pied des larves pédivéligères de *C. gigas* ont permis d'identifier de nombreuses similitudes avec le pied d'*O. edulis*, de *C. virginica*, de *M. edulis* et de *P. maximus*. La taille, ainsi que la morphologie générale du pied sont très similaires chez ces espèces (Cranfield, 1973a; Elston, 1980; Gruffydd *et al.*, 1975; Lane and Nott, 1975). Les comparaisons morphologiques effectuées par Gruffydd *et al.* (1975) entre les larves pédivéligères d'*O. edulis*, *M. edulis* et *P. maximus* tendent également à montrer que les principales structures morphologiques du pied se retrouvent chez ces 3 mollusques bivalves, avec quelques spécificités propres à chaque espèce (Figure 26, Tableau 2). Les différences observées peuvent résulter de la précision de l'effort de caractérisation et d'une variabilité d'appréciation des observations microscopiques par les différents auteurs (Cranfield, 1973a, 1973b, 1973c; Elston, 1980; Gruffydd *et al.*, 1975; Lane and Nott, 1975). Chez *C. virginica*, le *ciliated duct* est complété par deux autres orifices nommés *byssus duct* par lesquels s'écoule la sécrétion de l'adhésif en provenance de la glande byssale (comparable à la glande C chez *C. gigas*) (Elston, 1980). Ces orifices, ont également été décrits chez *O. edulis*, *M. edulis* et *P. maximus*. Chez *C. gigas*, nos observations ont permis d'identifier uniquement le canal byssal, qui est comparable morphologiquement au *ciliated duct* de *C. virginica*, et au *byssus duct* de *O. edulis*, *M. edulis* et *P. maximus*, et par lequel semble s'écouler la sécrétion permettant la fixation de la larve. Cependant, il est probable qu'une analyse plus

approfondie en microscopie électronique en transmission pourrait révéler la présence de canaux annexes chez *C. gigas*. Les larves des mollusques bivalves semblent toutes présenter une phase de fixation qui précède la métamorphose (Bayne, 2017; Gruffydd *et al.*, 1975). Les similitudes observées dans les descriptions disponibles des pieds des larves pédivéligères de mollusques bivalves pourraient indiquer que la structure de cet organe dédié à l'adhésion serait similaire chez toutes les espèces appartenant à cette classe.

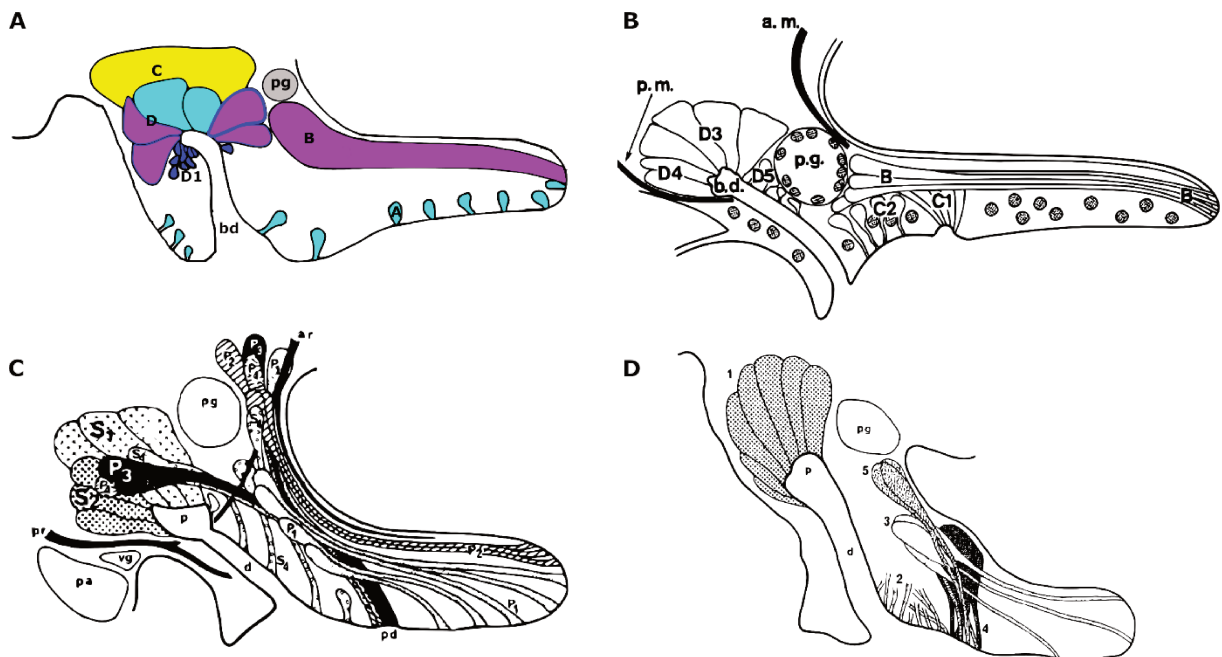


Figure 26 : Description morphologique du pied des larves pédivéligères de *Crassostrea gigas* (A), *Ostrea edulis* (Cranfield, 1973a) (B), *Mytilus edulis* (Lane and Nott, 1975) (C) et *Pecten maximus* (Gruffydd *et al.*, 1975). Le nom des différentes glandes identifiées par les auteurs est repris dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Proposition d'homologies des glandes identifiées dans le pied des larves pédivéligères de mollusques bivalves. D'après les données présentées par Gruffydd *et al.* (1975), actualisées par les observations menées chez *C. gigas*. * phénol-oxydases détectées par histochimie.

Espèces	<i>C. gigas</i>	<i>O. edulis</i>	<i>C. virginica</i>	<i>M. edulis</i>	<i>P. maximus</i>		
Références	Foulon <i>et al.</i> 2018	Cranfield H.J. 1973	Elston R. 1980	Lane & Nott 1975	Gruffydd <i>et al.</i> 1975		
	Identification des glandes					Composition	Fonction
	A	A		P1	3	Muco-polysaccharides acides	Lubrification du pied au début du <i>crawling</i>
	B	B		P2	3?	Polysaccharides neutres / Glycoprotéines	Attachement de l'extrémité du pied lors du <i>crawling</i>
	C	C1*	« Byssal gland »	P3*	4*	Protéines	Fixation définitive avant métamorphose
		C2*		P4*	5*	Protéines	
	Groupe D	D3 (A, B)	« R ₁ cells »	S1	2	Muco-polysaccharides acides	Formation des filaments de byssus à la fin du <i>crawling</i>
				S4			
		D4 (A, B)		S2	1	Muco-polysaccharides acides	
		D1				Muco-polysaccharides acides sulfatés	
		D2					
		D5		S3		?	
				S5			

Chez *C. gigas*, 3 groupes de glandes, présentant un contenu riche en polysaccharides, ont été observés par coloration tétrachrome (glandes A, B et D). Ces glandes ont été décrites chez *O. edulis*, dont nous avons repris la nomenclature, et sont indiquées comme intervenant lors de la phase de *crawling* (Cranfield, 1973c). Le comportement de *crawling* a également été observé chez la larve pédivéligère de *C. gigas*. Une étude comportementale précise, menée chez *O. edulis*, a permis de décrire 6 phases de *crawling* au cours desquelles la larve présente un comportement évolutif (Cranfield, 1973b). Ce

comportement évolutif, a également été observé chez *C. gigas* lors de notre étude (Figure 27), débutant par une exploration rapide du substrat concomitante avec une activité intense des cils du pied. La face ventrale du pied est en contact direct avec le substrat lors de cette phase, sécrétant probablement des « molécules polysaccharidiques » de faible adhérence, pouvant être apparentée à un mucus, permettant à la larve de « glisser » sur le substrat à l'aide d'une activité intense des cils du pied. Ce comportement est décrit comme la phase 1 de *crawling* chez *O. edulis*. Ainsi, les glandes A, situées au sein de l'épithélium de la face ventrale du pied interviennent probablement lors de cette phase.

La larve de *C. gigas* change ensuite de comportement, l'extrémité du pied adhère au substrat, le pied se contracte musculairement, permettant à la larve d'avancer. Ce comportement de locomotion est décrit dans les phases de *crawling* 2 à 5 (*muscular crawling*) chez *O. edulis*. Chez les larves de *C. gigas* prélevées en phase de *crawling* et observées en MEB, cette zone du pied présente un écrasement des cils et un épithélium couvert de vésicules de sécrétion. Il est probable que ces vésicules proviennent des glandes B, qui parcourent le pied sur sa longueur et débouchent à son extrémité. La coloration violette de cette glande (coloration tétrachrome) indique un contenu polysaccharidique et la présence éventuelle de glycoprotéines, également relevés pour la glande B chez *O. edulis*. Il est probable que la sécrétion de glycoprotéines à l'extrémité du pied soit responsable d'une adhésion plus forte que celle générée par les glandes A utilisées précédemment. Autour du canal byssal, les glandes D sont composées de cellules présentant des réactions différentes à la coloration tétrachrome. Ainsi, les petites cellules colorées en bleu, présentes sur la partie inférieure du canal byssal, sont similaires aux glandes D1 décrites chez *O. edulis* (Cranfield, 1973a, 1973c). Cette glande qui débouche à la base du talon du pied, intervient probablement lors des changements de directions de la larve, permettant alors l'adhésion du talon du pied au substrat afin de pivoter. Les changements de direction de la larve augmentent au cours du *crawling* pour devenir récurrents à chaque contraction du pied juste avant la libération de l'adhésif final. Les cellules présentant une coloration mauve avec un pourtour bleu foncé peuvent être apparentées aux glandes D2, D3 ou D4 chez *O. edulis* (Cranfield, 1973a, 1973c). L'ensemble de ces glandes D composent le complexe byssal qui serait responsable de la sécrétion des filaments de byssus observés autour des larves adhérentes. Les filaments de byssus sont également visibles par réflexion en microscopie optique. Ils sont émis à la fin de la phase de *crawling*, lorsque la larve reste dans la même zone en décrivant un cheminement en étoile. Ils permettent probablement à la larve de se stabiliser avant la sécrétion de l'adhésif final qui lui permettra de se fixer au substrat définitivement (phase 6 chez *O. edulis* ou « *cementing* »). Il est probable que le sillon observé le long de la face antérieure du pied puisse intervenir dans la sécrétion de ces filaments. En effet, chez la

moule adulte, le pied, hautement spécialisé dans la sécrétion de filaments de byssus présente également un sillon, essentiel à la formation de ces filaments (Andrade *et al.*, 2015; Waite, 2017).

Lors du *crawling*, le pied de la larve permet la locomotion par adhésion réversible. La sécrétion d'adhésif riche en polysaccharides ou glycoprotéines lors de cette phase d'exploration est en accord avec l'utilisation d'un adhésif réversible. En effet, les « gels adhésifs » ou mucus permettant l'adhésion réversible de certains gastéropodes résultent majoritairement de polymères de haut poids moléculaire, composés majoritairement de polysaccharides et de glycoprotéines (Álvarez Nogal and Molist García, 2015; Dou *et al.*, 2018; Smith, 2002, 2006). Contrairement aux adhésifs permanents, composés généralement uniquement de protéines, les adhésifs réversibles sont majoritairement composés d'un mélange de polysaccharides et de protéines (Dodou *et al.*, 2011). Les différentes glandes intervenant au cours du *crawling* sont présentées sur la Figure 27.

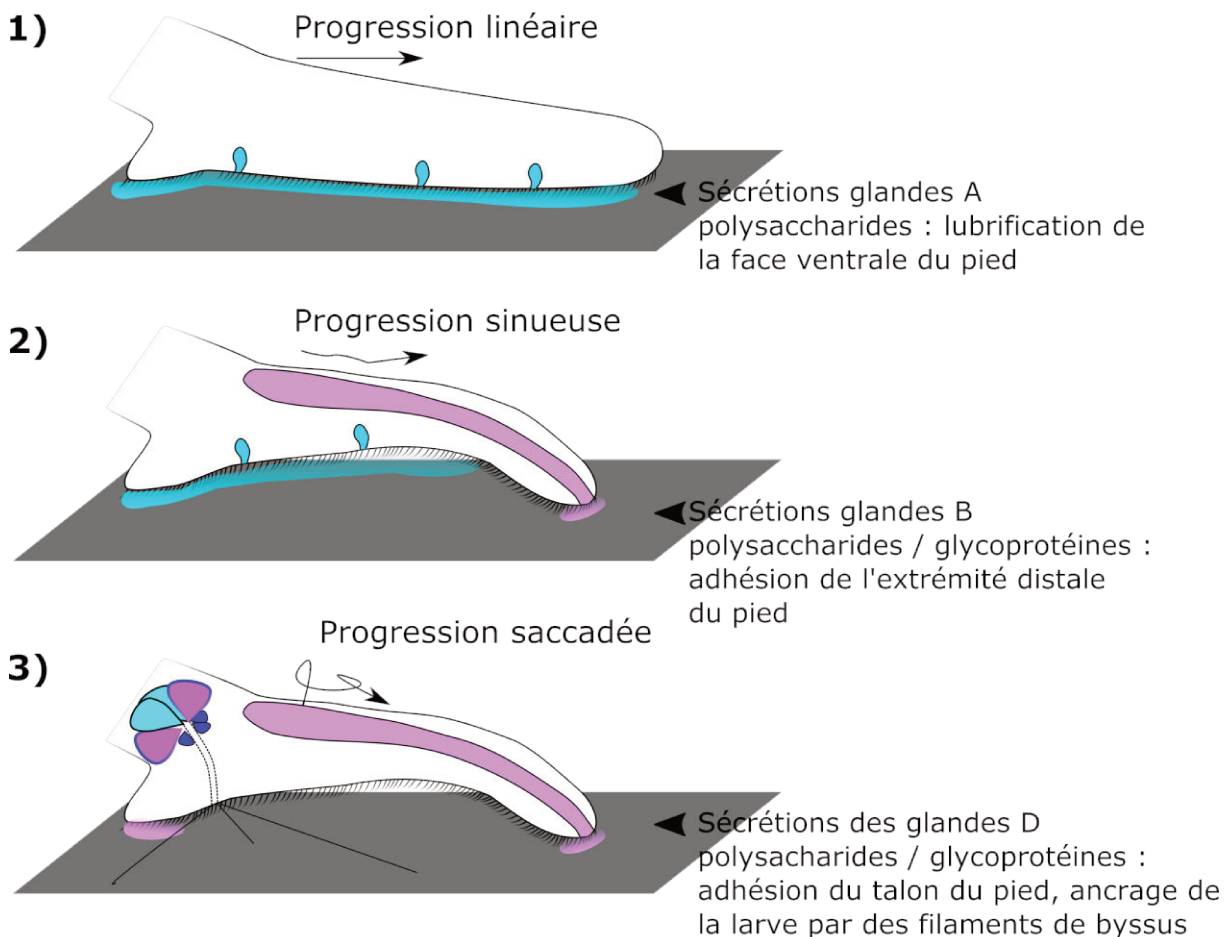


Figure 27 : Comportement évolutif du pied de la larve pédivéligère de *Crassostrea gigas* au cours du *crawling*. 1) Lors du début du *crawling*, les glandes A sécrètent une substance polysaccharidique sur la face ventrale du pied, allongé dans le sens de déplacement de la larve. 2) L'extrémité distale du pied s'adhère au substrat par sécrétions vésiculaires de la glande B, permettant la progression de la larve par contractions musculaires. 3) Des filaments de byssus sont produits par la larve, probablement par le groupe de glandes D situées autour du canal byssal. Le talon du pied présente également une adhésion. Les contractions musculaires du pied se font dans des directions variables.

3.2 Libération de l'adhésif final, composition globale

A la fin de la phase de *crawling*, le pied de la larve *C. gigas* s'élargit devant les valves durant quelques secondes. Il est probable que ce comportement contribue à préparer le substrat par la sécrétion de composés permettant l'accroche de l'adhésif final. Chez la moule adulte, la sécrétion des protéines composant la plaque byssale est précédée d'une acidification de la cavitation entre le pied et le substrat, suivie d'une balance oxydo-réductrice dont le mécanisme exact reste hypothétique (Martinez Rodriguez *et al.*, 2015; Waite, 2017). Cette étape permettrait « d'activer » le mélange adhésif, qui polymérise ensuite rapidement au contact du pH basique de l'eau de mer. La sécrétion de l'adhésif final fait intervenir la glande principale du pied, la glande C. Située à la base du pied, proche de la cavité viscérale, cette glande est visible en microscopie optique chez les larves vivantes en phase de *crawling*, présentant une coloration légèrement brune. Occupant un volume important de cette zone du pied, le contenu de la glande C est libéré lors de l'attachement final de la larve de *C. gigas*, à la fin de la phase de *crawling* (phase 6 chez *O. edulis*). Quelques secondes avant la libération de l'adhésif, des contractions des valves provoquant des pressions sur le pied ont été observées. Une contraction puissante des muscles du pied autour de la glande C provoque enfin la libération de l'adhésif entre le substrat et la valve gauche de la larve qui est alors immédiatement solidement fixée (Supplementary video – Foulon *et al.* 2018). La glande C est appelée C1 chez *O. edulis* (Cranfield, 1973a), glande byssale chez *C. virginica* (Elston, 1980), P3 chez *M. edulis* (Lane and Nott, 1975), et glande 5 ou 4 chez *P. maximus* (Gruffydd *et al.*, 1975). La particularité de cette glande est sa richesse en contenu protéique permettant son identification aisée par la visualisation de nombreux granules roses très éosinophiles en coloration HE et jaunes avec une coloration à l'acide picrique. D'après Cranfield (1973a), la glande C1 présente chez *O. edulis* des granules de phénol-oxydase d'une taille inférieure à 250 nm. Ce type de granules n'a pas été observé chez *C. gigas* après marquage histologique selon la méthode de Arnow (Arnow, 1937). Un marquage en microscopie électronique en transmission serait nécessaire pour déterminer la présence éventuelle de ces granules chez *C. gigas*. Les cellules sécrétrices de la glande C présentent une très grande concentration de réticulum endoplasmique et de vésicules de Golgi visibles en microscopie électronique en transmission. Ces structures typiques des cellules sécrétrices indiquent une activité cellulaire importante. La grande quantité de structures tubulaires provenant du réticulum endoplasmique observée autour des vésicules permet probablement un acheminement des protéines dans les vésicules de sécrétion. Ces structures ont également été observées autour des vésicules de sécrétion de la glande C1 chez *O. edulis* (Cranfield, 1973a, 1973c, 1975). Les mécanismes précis de biosynthèse des vésicules d'adhésif chez la larve de *C. gigas* restent inconnus, cependant, la présence de vésicules immatures au sein des cellules de sécrétion et de vésicules matures au sein de la glande laisse à supposer un mécanisme de sécrétion orienté vers le centre de la glande C.

La coloration tétrachrome effectuée sur les empreintes d'adhésif de *C. gigas* indique une composition majoritairement protéique avec une coloration jaune vif des deux zones, confirmant le rôle majeur de la glande C dans la sécrétion de l'adhésif. La présence de groupements oxydo-réducteurs a été mise en évidence par la coloration au nitro-bleu de tétrazolium, mais la présence de groupements catéchol n'a pas été identifiée. Il est probable que des enzymes oxydo-réductrices soient co-sécrétées ou immobilisées au sein des fibres d'adhésif, et que les groupements catéchol soient oxydés ou hydroxylés après sécrétion, comme observé chez les polychètes (Becker *et al.*, 2012). Le spectre infrarouge de l'adhésif de *C. gigas* indique également une composition protéique des fibres, similaire à celle de l'adhésif des larves pédivéligères de *Mytilus galloprovincialis* et *Perna canaliculus* (Gao *et al.*, 2007; Petrone *et al.*, 2008). Les protéines jouent un rôle essentiel dans la plupart des adhésifs marins (Hennebert *et al.*, 2014a), notamment chez les mollusques (Aldred and Petrone, 2016; Smith and Callow, 2006).

Observée en MEB, la structure fibreuse de l'adhésif de *C. gigas* est très proche de celle décrite chez *O. edulis* et *C. virginica* (Cranfield, 1975; Tibabuzo Perdomo *et al.*, 2018). Il est probable que la structure fibreuse distincte entre les zones interne et externe de l'adhésif puisse résulter d'une différence de composition, impliquant l'intervention de glandes différentes de la glande C chez *C. gigas*. Chez *O. edulis*, l'observation de l'adhésif en MET a permis de mettre en évidence 4 organisations de fibres au sein de l'adhésif. Ces structures résulteraient d'une différence de composition, provenant de la sécrétion des glandes du pied et de sécrétions du manteau (Cranfield, 1974). Chez *C. gigas*, l'intervention du manteau n'a pas été observée lors de l'adhésion. L'empreinte moléculaire obtenue par FTIR de la zone externe et interne de l'adhésif ne montre pas de différences notables de composition, la variation d'intensité des pics observée étant attribuée à la variation de l'épaisseur de l'échantillon entre les deux zones. Les mécanismes de formation des deux zones fibreuses chez *C. gigas* restent donc à déterminer.

La présence de soufre au sein de l'adhésif de la larve de *C. gigas* a été détectée par l'analyse EDS. Il est probable que des ponts disulfures soient présents au sein de l'adhésif, permettant les liaisons entre les protéines comme cela a déjà été rapporté dans de nombreux bioadhésifs marins (échinodermes, moules, polychètes, balanes, gastéropodes) (Benedict and Waite, 1986; DeMoor *et al.*, 2003; Flammang *et al.*, 1998; Kamino *et al.*, 2000; Naldrett and Kaplan, 1997; Petrone *et al.*, 2008). La présence de soufre au sein de l'adhésif peut également résulter des polysaccharides sulfatés. Les polysaccharides sulfatés jouent un rôle dans l'adhésion des micro et macroalgues (Daniel *et al.*, 1987; Forbes and Hallam, 1979; Wetherbee *et al.*, 1998), ainsi que dans la structure des mucus chez les mollusques (Davies and Hawkins, 1998). La coloration tétrachrome des empreintes d'adhésif de *C. gigas* a révélé parmi les fibres protéiques la présence de quelques amas d'une coloration bleue ou

violette, indiquant la présence de polysaccharides. Les pics observés en spectroscopie infrarouge autour de 1 240 et 1 245 cm^{-1} peuvent également indiquer la présence de polysaccharides au sein des empreintes. Cependant, ces amas ne semblent pas présenter de structures ordonnées. Il est probable que les polysaccharides au sein des empreintes d'adhésif de *C. gigas* proviennent de débris cellulaires ou de mucus, mélangés à l'adhésif lors de sa sécrétion.

La détection de calcium, de fer et de magnésium dans l'adhésif peut indiquer la présence d'interactions ioniques avec ces éléments, qui jouent un rôle clé dans certains bioadhésifs marins (Hennebert *et al.*, 2014a; Priemel *et al.*, 2017; Von Byern and Grunwald, 2010). La détection du phosphore est particulièrement intéressante, puisque ce résultat pourrait indiquer la présence de protéines phosphorylées. Cette modification des protéines a été décrite dans certains mécanismes bioadhésifs (Dickinson *et al.*, 2016; Flammang *et al.*, 2009; Hennebert *et al.*, 2014a). La présence de Mg dans l'adhésif pourrait indiquer une complexation avec les phosphoprotéines (Stewart *et al.*, 2017). Cependant, l'absence de localisation spécifique lors de la cartographie EDS de ces éléments soulève des doutes sur l'implication réelle des groupements phosphates dans les mécanismes d'adhésion chez la larve de *C. gigas*. Les spectres FTIR n'excluent pas la présence de phosphosérine dans la région comprise entre 900 et 1200 cm^{-1} (Petroni, 2013), ce qui encourage la poursuite d'études spécifiques concernant ces modifications protéiques dans l'adhésif de la larve de *C. gigas*.

4 Conclusion

Les descriptions morphologiques du pied et de l'adhésif sécrété par la larve pédivéligère de *C. gigas* ont permis d'une part de compléter les travaux publiés antérieurement sur les autres espèces de bivalve, et d'autre part, de mettre en évidence une forte homologie avec d'autres espèces telles que *O. edulis*. Malgré certaines différences propres à chaque espèce concernant l'identification des glandes adhésives chez les larves pédivéligères de mollusques bivalves étudiées, des homologies ont pu être mises en évidence (Tableau 2).

La caractérisation moléculaire globale de l'adhésif de *C. gigas* révélée par les colorations histologiques, l'analyse EDS, et la spectroscopie infra-rouge indiquent une composition de nature majoritairement protéique et l'intervention de processus d'oxydo-réduction dans l'adhésif. Ce résultat concorde avec l'hypothèse de travail, la majorité des bioadhésifs marins animaux décrits à ce jour dans la littérature étant composés de protéines (Hennebert *et al.*, 2014a). Ce résultat permet d'envisager une analyse protéomique de l'adhésif afin de déterminer sa composition précise, et de comprendre les interactions moléculaires à l'origine de sa polymérisation rapide et de sa résistance. La faible quantité d'adhésif sécrété par larve (quelques centaines de picolitres d'adhésif par empreinte) constitue un enjeu majeur

pour cette étude. Cependant, l'un des leviers pour relever ce défi est apporté par la disponibilité du génome de *C. gigas*, livrant également des données transcriptomiques récoltées à chaque stade de développement (Zhang *et al.*, 2012).

CHAPITRE IV

Recherche de gènes impliqués dans la sécrétion et la composition de l'adhésif de *Crassostrea gigas*

1 Introduction

Le développement des méthodes de séquençage haut débit des acides nucléiques (ADN et ARN), a permis une croissance exponentielle du nombre de séquences disponibles dans des bases de données généralistes ou ciblées (pour le transcriptome de *C. gigas* : Riviere *et al.* (2015)). L'utilisation d'outils informatiques adaptés permet d'identifier des séquences d'intérêt dans les bases de données, de les comparer, de les analyser et de définir leurs rôles biologiques potentiels (Rodrigues *et al.*, 2014). De nombreuses études, dites « *in silico* », utilisent les données génomiques disponibles afin d'identifier les gènes impliqués dans un processus biologique défini dans le but de répondre à une hypothèse de travail. Les critères de sélection des séquences (taux d'expression génomique, spécificité des organes ou de certains stades de développement, annotations fonctionnelles) sont choisis en fonction des questions biologiques posées. Les méta-analyses basées sur l'analyse de génomes publiés se font de plus en plus nombreuses (Makarev *et al.*, 2017; Mitchell *et al.*, 2016). Chez *Crassostrea gigas*, une récente étude focalisée sur la photosensibilité de l'adulte, a utilisé cette méthode pour identifier des gènes impliqués dans ce processus (Wu *et al.*, 2018).

Les analyses globales de caractérisation moléculaires de l'adhésif sécrété par les larves pédivéligères de *C. gigas* révèlent une composition de nature majoritairement protéique. L'adhésif est synthétisé et stocké avant sécrétion dans des glandes localisées dans le pied. Le pied est un organe spécifique du stade pédivéligère, dont la morphogénèse est une étape rapide (24 à 48h). Ceci indique que la synthèse de l'adhésif est également un processus rapide, résultant d'une activité cellulaire du pied importante et épisodique. La synthèse des protéines résulte de la transcription de l'information génétique et de la traduction de l'ARNm. La présence d'un ARNm au sein d'un organisme à un temps donné constitue donc une indication quant à la synthèse d'une protéine. Cependant, le temps de translation d'un ARNm en protéine est très variable, de quelques minutes à quelques heures (Dermitt *et al.*, 2017; Morisaki *et al.*, 2016), et la détection d'un ARNm ne permet pas de valider rigoureusement la présence de la protéine correspondante à un temps donné. Cependant l'identification des gènes exprimés à un moment donné peut tout de même permettre d'apporter des arguments de discussion quant à l'implication de celui-ci dans un processus biologique.

De nombreuses études transcriptomiques ont été menées récemment sur les organes sécréteurs de bioadhésifs, permettant d'identifier des gènes candidats de l'adhésion. Chez les cnidaires du genre *Hydra*, Rodrigues *et al.* (2016) ont mis en évidence par une approche couplée de transcriptomique et protéomique des gènes et protéines candidats, ainsi que des enzymes potentiellement impliquées dans la polymérisation de l'adhésif. Une approche similaire, menée sur le pied et le byssus de *Chlamys farreri* a permis de mettre en évidence une stratégie moléculaire d'adhésion différente de celle décrite

chez les moules malgré les homologies morphologiques observées entre ces organismes (Miao *et al.*, 2015). D'autre part, le transcriptome du pied de *Mytilus coruscus* a permis d'identifier des séquences présentant une forte homologie avec les séquences adhésives d'autres *Mytilidae* (Pan *et al.*, 2015). Une étude transcriptomique, menée sur la glande adhésive de polychètes de la famille des *Sabellariidae*, a récemment décrit l'évolution phylogénétique de certains gènes relatifs à l'adhésion, et mis en évidence l'importance des modifications post-traductionnelles des protéines adhésives (Buffet *et al.*, 2018). Les analyses transcriptomiques sont décrites comme un outil d'approche efficace afin de déterminer des gènes candidats chez les organismes marins, mais doivent être validées par d'autres investigations moléculaires et fonctionnelles (Hennebert *et al.*, 2014a; Pennati and Rothbacher, 2015). Cette approche permet notamment de s'affranchir des contraintes de nombreux bioadhésifs, telles que leur insolubilité, ou leur faible quantité. Dans le cas de notre étude, la première version de l'assemblage du génome de l'huître creuse *C. gigas*, publiée en 2012 par Zhang *et al.* est une ressource particulièrement intéressante. Les données transcriptomiques également publiées dans cet article sont disponibles dans les « *supplementary data* ». La table S14 regroupe les RPKM (read per kilobase million) de chacun des gènes, pour chaque stade de développement. Ces données permettent de visualiser le taux d'expression de chacune des séquences génomiques. Les stades de développement sont définis par le nombre de jours post-fécondation. Les stades pédivéligères nommés P1 et P2 correspondent à des larves âgées de 18 jours.

Ainsi, afin d'identifier chez *C. gigas* les séquences d'ARNm spécifiquement présentes au stade pédivéligère, une sélection basée sur les RPKM du tableau S14 de Zhang *et al.* 2012 a été réalisée. Les critères de sélection ont été définis afin de minorer l'éventuelle hétérogénéité de la cohorte larvaire et de prendre en compte le temps de translation des ARNm. Ainsi, les RPKM des stades LU1 et LU2 (J14 et J15 post-fécondation) sont inférieurs à 70% du RPKM de P1 ou P2 (J18 post-fécondation) et les RPKM de tous les autres stades et organes adultes sont inférieurs à 20% du RPKM de P1 ou P2.

L'objectif de ce chapitre est de rechercher dans les données transcriptomiques publiées avec le génome de *C. gigas*, des gènes présentant un rôle potentiel dans l'adhésion de la larve pédivéligère. L'identification de ces gènes pourrait permettre de proposer une composition protéique probable de l'adhésif, mais également d'identifier des voies de biosynthèse et des cascades moléculaires impliquées dans la sécrétion et la réticulation de celui-ci. Les séquences spécifiquement exprimées au stade pédivéligère et le rôle potentiel des protéines correspondantes seront donc présentés dans ce chapitre. Après annotations fonctionnelles des séquences, certaines présentant des caractéristiques intéressantes vis-à-vis de l'adhésion peuvent être considérées comme des candidats pertinents pour de futures investigations moléculaires.

2 Résultats : gènes spécifiquement exprimés au stade pédivéligère

Cinquante-neuf séquences ont été sélectionnées comme étant spécifiquement exprimées au stade pédivéligère (Tableau 3). Ces 59 séquences représentent 0,23% des 27 902 séquences présentes dans le tableau supplémentaire S14 de Zhang *et al.* (2012). Vingt et une séquences, soit 35,6% des séquences sélectionnées ont été annotées comme protéines hypothétiques, indiquant l'absence de fonctions connues dans les bases de données. Le nombre de séquences non caractérisées est un peu plus faible, que les 41,8% de séquences annotées comme protéines hypothétiques dans l'ensemble de la base de données. 38 séquences présentent au moins un domaine conservé et/ou une séquence répétée d'après l'analyse par le programme InterPro (Finn *et al.*, 2016) (Figure 28). Quarante-deux séquences ont une localisation extracellulaire d'après le programme DeepLoc 1.0 (Almagro Armenteros *et al.*, 2017). Afin de faciliter les comparaisons avec les analyses protéomiques du chapitre suivant, les gènes seront identifiés par leur « Protéine ID » correspondant. Le « Protéine ID » correspond au numéro d'accèsion de la séquence protéique correspondante au gène dans la base de données du NCBI. Egalement dans le but de faciliter les comparaisons éventuelles des gènes et protéines dans les bases de données, leur nom anglais sera conservé dans ce chapitre.

Tableau 3 : Gènes spécifiquement exprimés au stade pédivéligère de *Crassostrea gigas* selon les critères de sélections suivants : RPKM [stade précédant le stade pédivéligère (LU1 et LU2)] / RPKM [stade pédivéligère] > 0,7*RPKM [stade pédivéligère] et RPKM [autres stades] / RPKM [stade pédivéligère] > 0,2. RPKM de chaque gène issu des données transcriptomiques de Zhang *et al.* 2012. La colonne Loc. Cell. indique la prédiction de localisation subcellulaire par le programme DeepLoc 1.0. Ext : extracellulaire, Cyt : cytoplasme, Lys : Lysosome, Mit : mitochondrie, Pla : plaste, Mem : membrane cellulaire, ER : réticulum endoplasmique, Nuc : noyau.

Groupe	Gène ID	Protéine ID	Nom	Loc. Cell.
Protéine non caractérisée	CGI_10014580	EKC18206	hypothetical protein CGI_10014580	Mit 0.58
	CGI_10010208	EKC18972	hypothetical protein CGI_10010208	Ext 1
	CGI_10004853	EKC21005	hypothetical protein CGI_10004853	Ext 0.42
	CGI_10002578	EKC22248	hypothetical protein CGI_10002578	Ext 0.89
	CGI_10001746	EKC22673	hypothetical protein CGI_10001746	Ext 0.90
	CGI_10013335	EKC23310	hypothetical protein CGI_10013335	Nuc 0.50
	CGI_10013386	EKC24388	hypothetical protein CGI_10013386	Ext 0.41
	CGI_10005578	EKC25384	hypothetical protein CGI_10005578	Ext 0.43
	CGI_10013385	EKC24387	hypothetical protein CGI_10013385	Ext 0.60
	CGI_10003237	EKC27225	Hypothetical protein CGI_10003237	Ext 0.99
	CGI_10025142	EKC28625	hypothetical protein CGI_10025142	Ext 0.91
	CGI_10009961	EKC31321	hypothetical protein CGI_10009961	Ext 0.99
	CGI_10025191	EKC32101	hypothetical protein CGI_10025191	Cyt 0.38
	CGI_10012470	EKC33059	hypothetical protein CGI_10012470	Ext 0.99
	CGI_10016093	EKC35263	hypothetical protein CGI_10016093	Ext 0.52
	CGI_10016094	EKC35264	hypothetical protein CGI_10016094	Ext 0.52
	CGI_10027526	EKC35968	hypothetical protein CGI_10027526	ER 0.40
	CGI_10026725	EKC38958	hypothetical protein CGI_10026725	Ext 0.62
	CGI_10022908	EKC41146	Hypothetical protein CGI_10022908	ER 0.25
	CGI_10008429	EKC41249	hypothetical protein CGI_10008429	Ext 0.90
CGI_10013282	EKC42653	hypothetical protein CGI_10013282	Nuc 0.59	
Enzyme	CGI_10009044	EKC19270	Putative tyrosinase-like protein tyr 1	Mem 0.82
	CGI_10014286	EKC25254	Putative tyrosinase-like protein tyr-3	Mem 0.99
	CGI_10006802	EKC29117	tyrosinase-like protein 1	Ext 0.64
	CGI_10016593	EKC32997	peroxidase-like protein	Ext 0.49
	CGI_10010889	EKC32754	carbonic anhydrase 2	Cyt 0.41
	CGI_10011324	EKC18733	Carbonic anhydrase 7	Ext 0.65
	CGI_10003099	EKC28981	cell surface hyaluronidase-like	Plast 0.39
	CGI_10003100	EKC28982	cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein-like	Cyt 0.29
	CGI_10007190	EKC19955	Metalloendopeptidase	Ext 0.39
	CGI_10007191	EKC19956	Metalloendopeptidase	Ext 0.51
	CGI_10020760	EKC31184	Zinc metalloproteinase nas-15	Ext 0.70
	Inhibiteur de protéase	CGI_10010154	EKC18991	serine protease inhibitor dipetalogastin-like
CGI_10010155		EKC18992	serine protease inhibitor dipetalogastin-like	Ext 1

Protéine de structure et composant extracellulaire	CGI_10005627	EKC20685	Hemicentin-1	Ext 0.72
	CGI_10010553	EKC18864	IgGFC-binding protein (zonadhesin like)	Ext 0.64
	CGI_10010554	EKC18865	IgGFC-binding protein (zonadhesin like)	Ext 0.72
	CGI_10010555	EKC18866	IgGFC-binding protein (zonadhesin like)	Ext 0.93
	CGI_10010556	EKC18867	IgGFC-binding protein (zonadhesin like)	Ext 0.60
	CGI_10010557	EKC18868	IgGFC-binding protein (zonadhesin like)	Ext 0.91
	CGI_10023170	EKC34632	IgGFC-binding protein	Ext 0.52
	CGI_10010465	EKC34579	Tenascin-X	Ext 0.80
	CGI_10000981	EKC39076	Tenascin-R	Ext 0.84
	CGI_10025295	EKC40994	Multiple EGF-like domains 10	Ext 0.42
	CGI_10013281	EKC42652	Tenascin R	Ext 0.99
	CGI_10010827	EKC18813	collagen-like protein 7	Ext 0.89
	CGI_10010374	EKC27350	collagen-like protein 7	Mem 0.56
	CGI_10010375	EKC27351	collagen-like protein 7	Mem 0.72
	CGI_10011175	EKC27706	Collagen alpha-5(VI) chain	Ext 0.55
Protéine de la calcification et fixatrice de calcium	CGI_10010615	EKC18891	Aggrecan core protein	Ext 0.79
	CGI_10006917	EKC42164	Asialoglycoprotein receptor 2	Ext 0.99
	CGI_10006919	EKC42165	perlucin-like protein	Ext 0.95
	CGI_10006920	EKC42166	C-type mannose receptor 2	Ext 0.90
	CGI_10006921	EKC42167	perlucin-like protein	Ext 0.99
	CGI_10006922	EKC42168	perlucin-like protein	Ext 0.99
	CGI_10008331	EKC19532	protocadherin Fat 4-like	Lys 0.36
	CGI_10018326	EKC34251	Protocadherin Fat 4	Cyt 0.72
	CGI_10022907	EKC41145	protocadherin Fat 4-like	Cyt 0.44
CGI_10006247	EKC20329	Putative calmodulin	Cyt 0.48	



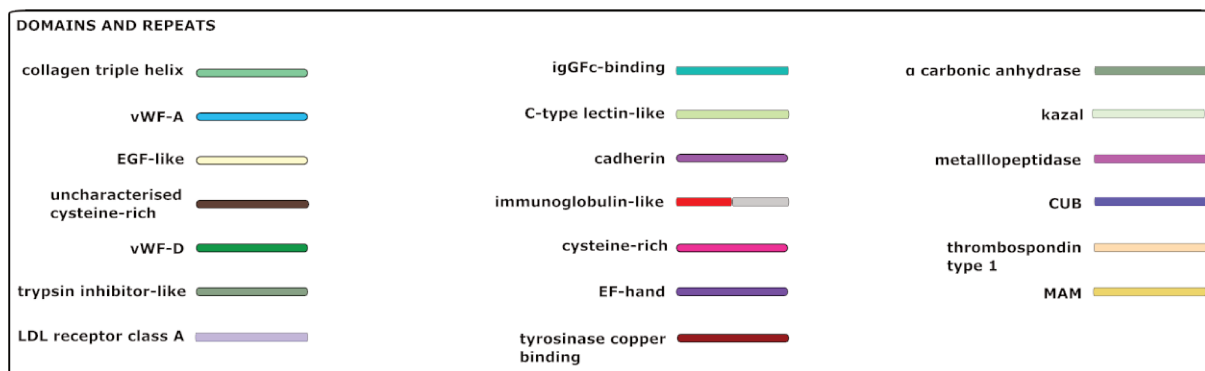


Figure 28 : Domaines conservés et séquences répétées détectés par le programme InterPro (Finn *et al.*, 2016) parmi 38 séquences spécifiquement exprimées au stade pédivéligère de *Crassostrea gigas*, d'après les données transcriptomiques publiées par Zhang *et al.* (2012).

3 Discussion

3.1 Séquences hypothétiques

A partir de l'analyse du Tableau 3, on observe que 21 séquences sont annotées comme *hypothetical protein*, dont 15 présentent une localisation extracellulaire d'après le programme DeepLoc 1.0, parmi lesquelles 9 présentent un peptide signal indiquant une sécrétion par voie classique (EKC18972, EKC21005, EKC22248, EKC22673, EKC27225, EKC28625, EKC31321, EKC32101, EKC35264). Les séquences EKC22673, EKC35263 et EKC35264, composées respectivement de 362, 101 et 183 acides aminés, présentent une hélice transmembranaire en position 280-302, 6-33 et 27-48. La séquence EKC41146 présente également un domaine transmembranaire. Il n'est actuellement pas possible de proposer un rôle dans l'adhésion pour ces gènes, du fait d'un manque d'information les concernant.

3.2 Séquences intervenant dans les mécanismes d'oxydo-réduction

Parmi les 59 séquences sélectionnées, 3 *tyrosinase like protein* (EKC19270, EKC2525254, EKC29117), et une *peroxydase like protein* (EKC32997), sont des enzymes participants aux mécanismes d'oxydo-réduction. La tyrosinase est une oxydoréductase, aussi appelée phénol-oxydase, qui permet l'hydroxylation (ajout d'un groupement -OH) de la partie aromatique des résidus tyrosine. La tyrosine hydroxylée, appelée 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA), peut à son tour être oxydée par la tyrosinase, devenant ainsi une dopaquinone, portant deux groupements =O. Les bioadhésifs marins à base de DOPA sont sensibles aux variations de pH et impliquent des mécanismes de coacervation (Stewart *et al.*, 2017; Waite, 2017). La coacervation est un mécanisme physico-chimique permettant la dissociation spontanée en deux phases d'un mélange de molécules, du fait de leurs charges opposées. Le plus connu est le byssus de moule, composé d'un filament et d'une plaque byssale en contact avec le

substrat. Lors de la formation de la plaque byssale par le pied de la moule adulte, l'adhésif est sécrété sous forme coacervée, et polymérise par des mécanismes d'oxydo-réduction médiés par le pH du milieu (Martinez Rodriguez *et al.*, 2015; Waite, 2017). Cette stratégie est également décrite dans l'adhésif des polychètes tubicoles *Sabellaria alveolata* et *Phragmatopoma californica* (Becker *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2004, 2017; Wang and Stewart, 2013). Les adhésifs à base de DOPA associés à un mécanisme de coacervation présentent une structure mousseuse après sécrétion. Ce n'est pas le cas de l'adhésif de la larve de *C. gigas*, présentant une structure fibreuse. Cependant, des granules de phénol-oxydase ont été rapportés dans la glande principale du pied de larves pédivéligères d'*O. edulis* par histochimie (Cranfield, 1973a). La présence de granules de phénol-oxydase n'a pas été confirmée chez *C. gigas*. D'autre part, il a été observé que les larves pédivéligères produisent des filaments de byssus avant l'adhésion permanente, à la fin de la phase de *crawling*. La petite taille de ces filaments ne permet de confirmer ni leur forme, ni l'existence d'une plaque byssale. Il est possible que des stratégies similaires de sécrétion de byssus soient utilisées chez les larves d'huîtres pédivéligères et chez les moules adultes. La tyrosinase EKC29117, qui est prédite pour une localisation extracellulaire, présente d'ailleurs 47,95% de similarité avec une séquence protéique byssale de *Mytilus corsus* (ANN45959 | *Byssal tyrosinase-like protein 2*). La séquence EKC2525254 présente une similitude de 46,19% avec une protéine analogue (AKI87982 | *Byssal tyrosinase-like protein-1*) (Qin *et al.*, 2016). Il est intéressant de noter que cette dernière séquence présente un domaine lectine de type C (position 67-187), indiquant une probable liaison à un polysaccharide. Ce site de liaison pourrait agir comme site d'activation ou d'inactivation de l'enzyme, comme cela a été observé lors de l'intervention des tyrosinases responsables de la synthèse de mélanine (Mikami *et al.*, 2013). La liaison à un groupement polysaccharidique pourrait également permettre l'immobilisation de l'enzyme au sein de l'adhésif une fois sécrétée. D'autre part, la présence d'enzymes actives glycosylées dans l'adhésif de larves de trichoptères a été rapportée (Wang *et al.*, 2015a).

Une autre séquence, annotée comme une enzyme liée aux mécanismes d'oxydo-réduction, a été détectée : EKC32997 | *peroxydase like protein*. Cette séquence présente une similarité de 44,8% avec une *Byssal peroxidase-like protein 1* de *Mytilus coruscus* (Qin *et al.*, 2016). Des peroxydases byssales ont également été détectées dans le pied de *Limnoperna fortunei* (Li *et al.*, 2018) et dans le byssus de *Pinctada fucata* (Liu *et al.*, 2016). Leur rôle demeure incertain, mais les peroxydases byssales pourraient intervenir dans la protection du byssus contre l'environnement oxydant et les microorganismes. La séquence EKC32997 présente un peptide signal indiquant une sécrétion extracellulaire de cette protéine. Ces enzymes peuvent également intervenir directement dans la réticulation de l'adhésif, comme décrit chez la larve de trichoptères *Hysperophylax occidentalis*, permettant l'établissement de liaisons entre les di-tyrosines qui stabilisent les fibres adhésives (Wang

et al., 2015a). La présence de peroxydases a également été signalée dans le disque basal du polype *Hydra magnipapillata* (Rodrigues *et al.*, 2016), à l'interface de la plaque adhésive chez la balane *Amphibalanus amphitrite* (So *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2015), dans le para-thorax des polychètes *Sabellaria alveolata* et *Phragmatopoma caudata* (Buffet *et al.*, 2018), ainsi que dans les organes adhésifs d'échinodermes (Hennebert *et al.*, 2015 ; Lebesgue *et al.*, 2016). Chez les algues, des haloperoxydases sont également impliquées lors de l'adhésion, permettant de catalyser les réactions d'oxydation des composés phénoliques présents dans les mucilages adhésifs (Berglin *et al.*, 2004; Vreeland *et al.*, 1998). L'ensemble de ces observations indique un rôle important de cette enzyme, notamment dans la biosynthèse de la DOPA et de ses dérivés.

La présence de séquences codantes pour des tyrosinases et peroxydases dans notre sélection chez la larve de *C. gigas* indique que cet organisme utilise probablement dans son adhésif les propriétés de la DOPA et les mécanismes d'oxydo-réduction qui lui sont associés.

Deux autres séquences codent pour des enzymes impliquées dans la balance oxydo-réductrice ont été sélectionnées : EKC32754 et EKC18733, annotées comme anhydrase carbonique. Etroitement liée à la calcification et important régulateur de la balance acido-basique, cette enzyme peut être impliquée dans les utilisations cellulaires du CO₂ à différents niveaux cellulaires (Hopkinson *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017b). Chez les mollusques, l'activité de l'anhydrase carbonique est associée à la calcification de la coquille, son domaine actif étant présent dans les nacréines (Zhang and Zhang, 2006). Cette enzyme est fortement exprimée dans le manteau des mollusques (McDougall and Degnan, 2018). A ce jour, l'anhydrase carbonique n'a jamais été signalée dans les études portant sur les bioadhésifs. Il est donc très probable que ces deux ARN messagers soient exprimés au stade pédivéligère dans le but de préparer la calcification rapide observée après la métamorphose. Il est à noter que l'adhésion des larves pédivéligères chez les mollusques bivalves implique comme interface supérieure la coquille. Ceci est unique dans les adhésifs de mollusques, puisque pour les bivalves adultes sécrétant un byssus, la liaison entre l'adhésif et l'organisme est assurée par les tissus du pied (Waite, 2017; Yoo *et al.*, 2016a). La liaison entre la coquille et l'adhésif chez la larve pédivéligère de *C. gigas* pourrait être consolidée par l'action de l'anhydrase carbonique, mobilisant le carbonate de la coquille. L'action de l'anhydrase carbonique permet également de réguler la présence de protons. Il a été montré que les protons jouent un rôle lors de la libération de la sécrétion du byssus chez la moule, permettant d'acidifier le milieu avant la libération des protéines byssales (Waite, 2017). Il est donc hypothétique mais possible que la présence de l'anhydrase carbonique au stade pédivéligère ait un lien avec l'adhésion.

La sélection de cet ensemble de gènes spécifiquement exprimés au stade pédivéligère, codant pour des protéines impliquées dans les mécanismes d'oxydo-réduction, est en lien avec l'observation par

histochimie de groupements oxydo-réducteurs au sein des empreintes d'adhésif (chapitre III). Ces enzymes pourraient jouer un rôle majeur dans l'adhésion chez *C. gigas*.

3.3 Protéases et Inhibiteurs d'enzymes

Des protéases ont également été détectées dans notre sélection. La séquence EKC19955 (métalloprotéinase) comporte deux domaines de type *Epidermal Growth-Factor* (EGF) (positions 277-312 et 438-476) et un domaine *complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1* (CUB) (position 320-438). La séquence EKC19956 présente la même architecture avec deux domaines de type EGF (positions 447-485 et 654-684), un domaine CUB (position 329-447) et un domaine *meprin, A-5 protein, and receptor protein-tyrosine phosphatase mu* (MAM) à la fin de la séquence (position 920-1074). La séquence EKC31184 a été annotée comme *Zinc metalloproteinase nas-15*, avec un domaine ZnMc (position 110-239). L'ensemble de ces protéases sont des métalloprotéinases, présentant une localisation extracellulaire, pouvant jouer un rôle dans le remaniement de la matrice extracellulaire lors de la métamorphose. Le rôle des métalloprotéinases est également rapporté dans les systèmes synaptiques et le développement neuronal. Le passage des larves au stade pédivéligère est accompagné d'un développement du système nerveux, le pied étant largement innervé. Il est probable que la présence de ces séquences soit en relation avec ce phénomène. De plus, immédiatement après l'adhésion, le pied disparaît lors de la métamorphose, indiquant un remaniement des tissus faisant probablement intervenir des protéases.

Des séquences inhibitrices de protéases ont également été sélectionnées. La séquence EKC25384 (*hypothetical protein CGI_10005578*) est annotée avec un "*Gene Ontology*" désignant une fonction moléculaire inhibitrice de métalloendoprotéinase. Récemment, une protéine spécifique du pied, portant une fonction similaire a été identifiée dans le byssus de *Chlamys farreri* (Miao *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018). Chez cette espèce, la protéine Sbp8-1 est un inhibiteur de métalloprotéinase atypique, composant du byssus et intervenant probablement dans les liaisons entre les différentes protéines byssales. Deux séquences annotées comme inhibiteurs de protéinases à sérine (EKC18991, EKC18992) sont spécifiques du stade pédivéligère. Les trois séquences EKC18864, EKC18865 et EKC18868 présentent un domaine de type inhibiteur de trypsine et les séquences EKC18867, EKC18868 présentent un domaine inhibiteur de protéase à sérine. L'expression d'inhibiteur de protéase à sérine a été détectée dans le pied de *Mytilisepta virgata* (Gerdol *et al.*, 2017) et de *Chlamys farreri* (Miao *et al.*, 2015).

Chez *C. gigas*, les inhibiteurs d'enzymes peuvent intervenir dans la protection de l'adhésif contre sa dégradation après sécrétion. En effet, la présence de l'adhésif sécrété au stade pédivéligère (14 jours

post-fécondation), est toujours observée chez des individus après 72 jours post-fécondation, indiquant la robustesse de ce biomatériau.

3.4 Séquences apparentées à la matrice extracellulaire

Deux séquences apparentées à des hyaluronidases sont spécifiques du stade pédivéligère : EKC28981 et EKC28982. Le rôle de ces séquences est difficile à déterminer. Les hyaluronidases présentent une activité hydrolytique sur l'acide hyaluronique et certaines formes de sulfate de chondroïtine, permettant notamment le remaniement de la matrice extracellulaire.

Six des séquences sélectionnées ont été annotées comme récepteur Fc (*IgGFc binding protein*) (EKC18864, EKC18865, EKC18865, EKC18866, EKC18867, EKC18868, EKC34632). Ces protéines sont généralement associées à l'immunité, fixant les antigènes des agents pathogènes. Chez l'homme, certaines *IgGFc binding protein* sont associées à la composition du mucus (Harada *et al.*, 1997). Ce type de protéine a été identifié dans le mucus de *Crassostrea virginica* (Espinosa *et al.*, 2016), impliqué dans la structure même du mucus par interactions avec les mucines. Lors de la phase d'exploration du substrat, la larve pédivéligère d'huître sécrète un adhésif réversible similaire au mucus par le biais des glandes A et B.

Il est probable que les *IgGFc binding protein* spécifiques du stade pédivéligère interviennent lors de la phase de crawling de *C. gigas*.

Présentant des propriétés d'adhésion, ces protéines peuvent également intervenir dans la structure même de l'adhésif final. En effet, certaines structures présentes au sein de ces séquences sont communes aux protéines adhésives. Des séquences *IgGFc binding protein* ont été identifiées dans les empreintes d'adhésif chez l'étoile de mer *Asterias rubens* (Hennebert *et al.*, 2015). La séquence EKC18867 arbore une série de 7 domaines EGF. Ce type de répétition a été observé chez une protéine de la plaque byssale (mfp2) chez la moule, qui comporte une répétition de 11 domaines EGF (Inoue *et al.*, 1995). Les séquences EKC18864, EKC18865 et EKC18868 présentent des régions riches en cystéine, indiquant potentiellement des capacités à établir des liaisons disulfures. Ces domaines peuvent également indiquer une conformation en repli de ces protéines. Ces séquences contiennent également des domaines de type von Willebrand Factor de type D (vWF-D) et EGF. Ce type de domaine est présent dans les protéines du byssus chez les moules et dans les protéines adhésives des étoiles de mer (Hennebert *et al.*, 2014b; Inoue *et al.*, 1995). La séquence EKC20685 (*hemicentin 1*) présente un domaine de type récepteur LDL (lipoprotéines de basse densité) et 3 domaines TSP-1 (thrombospondine de type 1), indiquant une localisation extracellulaire probable. Le rôle central d'une protéine contenant 3 domaines TSP-1 a été rapporté dans le byssus de *P. fucata* (Liu *et al.*, 2015), ils seraient probablement liés aux propriétés élastiques de la partie distale du filament.

Quatre séquences contenant un domaine EGF-like et apparentées à la ténascine ont été sélectionnées (EKC34579, EKC39076, EKC40994, EKC42652). Les ténascines sont généralement extracellulaires, glycosylées, et présentent des propriétés élastiques (Oberhauser *et al.*, 1998). La ténascine R peut présenter un rôle dans le développement du système nerveux (Anlar and Gunel-Ozcan, 2012). La ténascine X est une protéine présentant des fonctions architecturales primordiales, responsable des propriétés structurales de nombreux tissus, par liaisons à d'autres protéines constitutives (Valcourt *et al.*, 2015). Cette protéine extracellulaire intervient notamment dans l'adhésion cellulaire.

Parmi les séquences spécifiques du stade pédivéligère de *C. gigas*, 4 d'entre elles présentent un domaine triple hélice de collagène, d'une taille de 195 à 1693 acides aminés (EKC18813, EKC27350, EKC27351, EKC27706). Le collagène est une protéine structurale, formant la plupart du temps des structures fibreuses. Dans les bioadhésifs marins, le collagène est un constituant du filament de byssus sécrété par la moule (Pasche *et al.*, 2018; Suhre and Scheibel, 2014). Les séquences EKC18813, EKC27350 et EKC27351 présentent des teneurs élevées en glycine avec respectivement 25,7 %, 27,2 % et 23,3 %, proche des taux observés dans le byssus de *P. fucata*, *M. californianus* (Pasche *et al.*, 2018) et *M. edulis* (Waite *et al.*, 1992). Ces séquences présentent également une teneur élevée en proline, proche de 11%. La glycine et la proline sont essentielles à l'établissement de la triple hélice de collagène permettant la formation de fibres (Rich and Crick, 1955). La séquence EKC27706 présente un domaine von Willebrand Factor de type A (vWF-A), qui est un site de liaison des glycoprotéines. Les domaines vWF-A sont également impliqués dans la liaison aux collagènes, décrits chez le byssus de moule (Suhre *et al.*, 2014).

Chez la larve de *C. gigas*, la structure filamenteuse de l'adhésif est compatible avec une composition riche en collagène et la cohésion de l'adhésif pourraient résulter de la présence de domaines de type von Willebrand Factor.

3.5 Séquences calcifiantes

Les enzymes oxydo-réductrices telles que les tyrosinases (EKC19270, EKC2525254, EKC29117), la peroxydase (EKC32997), ainsi que les 2 anhydrases carboniques (EKC18733, EKC32754), peuvent être associées à la biocalcification. En effet, ces enzymes sont classiquement rapportées dans les processus de synthèse de la coquille chez les mollusques et pourraient coïncider avec le début de la production de la couche de calcite, après la métamorphose, au stade naissain chez *C. gigas*. Ces séquences sont pourtant peu exprimées au stade naissain comparativement au stade pédivéligère, mais aucune relation quantitative ne peut être faite à ce jour entre la valeur du RPKM observé pour un ARNm et l'abondance de la protéine correspondante. Nous noterons tout de même que ces séquences sont également peu exprimées au stade adulte, notamment dans le manteau, organe responsable de la

synthèse de la coquille. D'autre part, une étude récente chez *C. virginica*, met en évidence la succession de deux stratégies d'adhésion entre la larve pédivéligère et le naissain (Tibabuzo Perdomo *et al.*, 2018). Ainsi, la sécrétion de l'adhésif organique par la larve pédivéligère est ensuite suivie par la sécrétion d'un adhésif contenant une part inorganique plus importante, permettant à la coquille en croissance d'adhérer au substrat. Il apparaît également chez les mollusques que les protéines adhésives présentent des domaines et des fonctions moléculaires similaires avec les protéines dites calcifiantes. **Ainsi, la détection de tyrosinase, la présence de groupements DOPA, de domaines de liaisons aux polysaccharides, de domaines vWF, de domaines EGF, sont souvent communes aux protéines d'adhésion (Smith, 2016), notamment du byssus de mollusques bivalves (Inoue *et al.*, 1995; Waite, 2017), et à la calcification (McDougall and Degnan, 2018).**

Des séquences fixatrices de calcium, ont été sélectionnées : 3 *protocadherin Fat 4 like proteins* (EKC19532, EKC34251, EKC41145) et une *putative calmodulin* (EKC20329) contenant de multiples domaines EF-hand (main EF). Le domaine EF-hand est constitué de deux hélices alpha formant une boucle par interactions avec un ion Ca^{2+} . Une séquence annotée comme *hypothetical protein*, (EKC32101) présente également deux domaines de type EF-hand. Des protéines extracellulaires contenant un domaine EF-hand ont été rapportées dans le processus de calcification chez l'huître perlière (Huang *et al.*, 2007). La calmoduline est une protéine ubiquitaire, impliquée dans le métabolisme du calcium. Chez l'huître, cette protéine joue un rôle important pour la calcification (Li *et al.*, 2016). Cependant, il a été rapporté chez les oursins que des calmodulines pourraient intervenir dans la régulation de l'exocytose de l'adhésif, en lien avec la présence de calcium (Lebesgue *et al.*, 2016). Les protocadhérines FAT 4 contiennent de multiples domaines cadhérine, qui interviennent notamment dans les liaisons cellulaires (Takeichi, 1991). De nombreuses protocadhérines Fat 4, impliquées dans le développement du système nerveux ont été relevées chez les céphalopodes (Albertin *et al.*, 2015). D'autre part, les protéines contenant un site de liaison au Ca^{2+} jouent un rôle dans de nombreux processus cellulaires (maintien de l'homéostasie, contraction musculaire, différenciation cellulaire, adhésion cellulaire, immunité, transmission de signaux) (Zhao *et al.*, 2012).

A ce jour, des protéines contenant un domaine EF-hand n'ont pas été rapportées comme intervenant directement dans les bioadhésifs. Le rôle de ces séquences, spécifiquement exprimées au stade pédivéligère demeure inconnu. Elles pourraient coïncider avec la morphogénèse du pied et le développement du système nerveux, mais également avec la préparation de la métamorphose, ou encore avec la sécrétion de la coquille et de sa matrice adhésive après métamorphose (Tibabuzo Perdomo *et al.*, 2018).

Un ensemble de 6 séquences présente un domaine lectine de type C (*C-type lectin*) (EKC18891, EKC42164, EKC42165, EKC42166, EKC42167, EKC42168), qui est un domaine de liaison aux polysaccharides calcium dépendant (Drickamer, 1999). Ces 6 séquences sont apparentées à des perlucines. Les perlucines sont des protéines impliquées dans la calcification, permettant la nucléation de cristaux de carbonates de calcium (Blank *et al.*, 2003). Cependant, le profil d'expression de ces séquences soulève un doute quant à une réelle fonction « perlucine » de ces séquences. Les séquences EKC18191, EKC42164 et EKC42166 sont d'ailleurs annotées comme *Aggrecan core protein*, *Asialoglycoprotein receptor 2* et *C-type mannose receptor 2*. L'*aggrecan core protein* est chez les vertébrés une protéine constitutive du cartilage (Kiani *et al.*, 2002). Des séquences annotées comme *perlucin like* ont d'ailleurs été détectées dans le pied de *Chlamys farreri* (Miao *et al.*, 2015). Il est possible que ces séquences soient directement impliquées dans la composition de l'adhésif. Les domaines lectine de type C sont en effet présents dans de nombreux bioadhésifs (De Gregorio *et al.*, 2015; Flammang *et al.*, 2016; Hennebert *et al.*, 2014b; Peng *et al.*, 2014; Yoo *et al.*, 2016a). De plus, les séquences EKC18891, EKC42164, EKC42165, EKC42166, EKC42167, EKC42168 présentent respectivement 46%, 48%, 44%, 47%, 44% et 48% d'homologie par BLAST avec la *foot protein 1* (AIWO4139) d'*Atrina pectinata* (Yoo *et al.*, 2016a). L'alignement multiple des séquences (Figure 29) indique que le domaine C-type lectin est responsable de cette homologie.



Figure 29: Alignement de 5 séquences protéiques EKC18891, EKC42164, EKC42165, EKC42166, EKC42167, EKC42168, AIWO4139 par le programme COBAL (Constraint-based Multiple Alignment Tool) (Papadopoulos and Agarwala, 2007).

La coquille des larves de mollusque est composée d'une matrice inorganique polymorphe de CaCO_3 , et d'une matrice organique, le periostracum. Le lien entre l'adhésif et la coquille pourrait impliquer des liaisons avec le periostracum. Le periostracum est composé de glycoprotéines et de polysaccharides tels que la chitine (Peters, 1972).

Il est très probable que le domaine lectine de type C présent dans les séquences de type perlucine puisse permettre le lien entre le periostracum et l'adhésif.

4 Proposition d'un modèle d'interactions moléculaires au sein de l'adhésif de *C. gigas*

L'analyse *in silico* des données transcriptomiques réalisée à partir des données publiées sur le génome de l'huître *C. gigas* (Zhang *et al.*, 2012) a permis de sélectionner des transcrits très majoritairement exprimés au stade pédivéligère. Après analyse des domaines conservés et séquences répétées des 59 transcrits sélectionnés, il apparaît que la majorité présente une localisation extracellulaire très probable, et un intérêt dans le domaine des bioadhésifs. La Figure 30 présente l'implication hypothétique dans l'adhésion de certains domaines protéiques identifiés dans les gènes spécifiquement exprimés au stade pédivéligère de *C. gigas*.

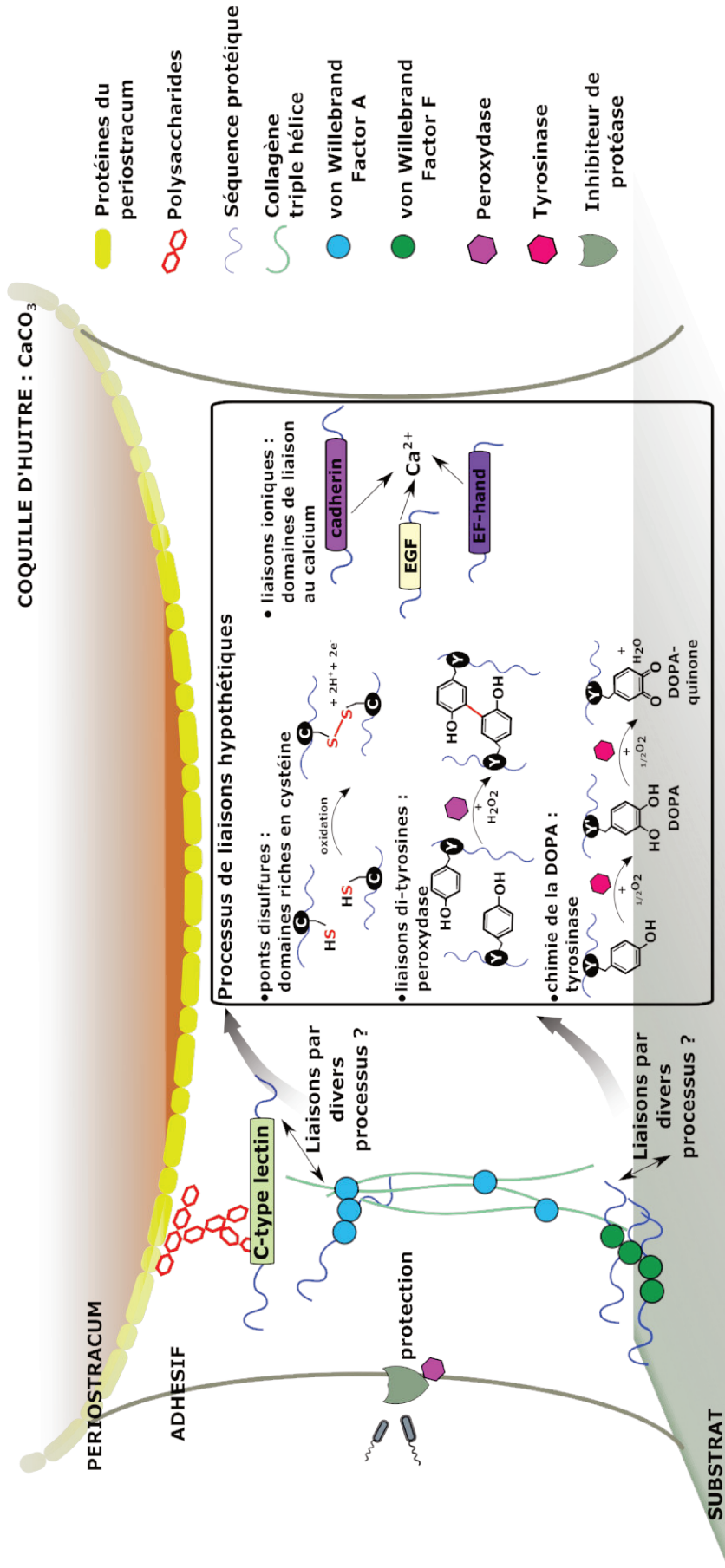


Figure 30: Représentation schématique des interactions moléculaires hypothétiques intervenant dans l'adhésion de la larve pédivéligère de *C. gigas*, basée sur la sélection des gènes spécifiquement exprimés au stade pédivéligère.

Ainsi, la présence de protéines structurales telles que le collagène, et de protéines riches en domaines vWF, concorde avec la structure fibreuse de l'adhésif sécrété par les larves de *C. gigas* au stade pédivéligrè. Ces protéines peuvent être proposées comme matrice centrale de l'adhésif, composant structurel des fibres. De plus, la présence de domaines vWF-A dans une séquence extracellulaire de collagène et de domaines vWF-D au sein des protéines *IgGFc binding protein* peut indiquer que ces domaines permettent le maintien de la structure adhésive par agrégation.

L'adhésif de *C. gigas* présente la particularité d'être en contact dans sa partie supérieure avec la coquille de la valve gauche de la larve composée de carbonate de calcium et d'une matrice organique : le periostracum. Le periostracum étant composé de protéines glycosylées et de polysaccharides, il est probable que les séquences apparentées aux perlucines, présentant un domaine lectine de type C, puissent lier l'adhésif au periostracum. La présence de ces protéines à l'extrémité des fibres structurales pourrait expliquer l'épaississement de celles-ci observé en MEB dans le chapitre précédent.

L'adhésif sécrété doit résister à l'environnement et ne pas être dégradé avant que la coquille du naissain n'ait atteint une taille assez importante pour assurer le maintien de l'huître sur son substrat. Les séquences sélectionnées lors de cette étude, contenant des domaines inhibiteurs de protéase et peroxydase pourraient intervenir dans la protection de l'adhésif contre la dégradation bactérienne. De plus, la répartition de *C. gigas* sur l'estran rend possible l'exposition de l'adhésif au rayonnement UV, à la dessiccation, à l'eau douce, et à des températures élevées, qui sont d'autant de facteurs de stress pour ce matériau.

Les liaisons chimiques intervenant dans le maintien de l'adhésif, et dans la liaison au substrat, peuvent être de différentes natures. Ainsi, les domaines riches en cystéine observés dans certaines séquences (EKC18864, EKC18865 et EKC18868) peuvent être impliqués dans la conformation structurale de ces protéines, mais également dans l'établissement de ponts disulfures. Les ponts disulfures peuvent également être établis entre d'autres protéines présentant des cystéines dans leur séquence. Ce type de liaisons présente l'avantage d'être réversible. La présence de séquences codantes pour des enzymes impliquées dans les mécanismes d'oxydo-réduction (tyrosinases, peroxydase) intervenant potentiellement dans la biosynthèse de la DOPA et de ces dérivés est particulièrement intéressante. En effet, cela permet d'envisager des mécanismes d'adhésion proches de ceux décrits dans le byssus des mollusques bivalves adultes. Les peroxydases, et tyrosinases peuvent ainsi permettre la formation respective de ponts dityrosines, et de groupements DOPA ou DOPA-quinone. La DOPA peut permettre la liaison avec le substrat, mais aussi entre les protéines de l'adhésif, par liaisons covalentes ou interactions ioniques. Des interactions ioniques peuvent également prendre place au sein de l'adhésif,

notamment avec la présence de protéines présentant des domaines ayant une affinité pour le calcium (*cadherin*, *EGF*, *EF-hand*). Il est très probable que la différence de structure observée entre les zones interne et externe de l'adhésif (chapitre III) puisse résulter de la présence dans la zone externe de protéines ou de groupements permettant l'établissement d'un nombre plus important de liaisons covalentes ou d'interactions ioniques, impliquant un resserrement du maillage adhésif.

5 Conclusion

Notre analyse *in silico* a permis la mise en évidence avec succès de gènes spécifiquement exprimés au stade pédivéligère, codant pour des protéines présentant des domaines potentiellement impliqués dans l'adhésion chez *Crassostrea gigas*. Les hypothèses formulées lors de cette analyse ont permis une avancée dans la compréhension de l'adhésion larvaire chez *C. gigas*. L'ensemble de 59 transcrits sélectionnés sont des candidats qui pourraient être explorés sur le plan fonctionnel par des approches existantes (hybridation *in situ* ARN, hybridation par anticorps, ARN interférent) et à développer (CRISPR). Ainsi, la localisation de ces transcrits et/ou des protéines correspondantes au sein de la larve pédivéligère et/ou des empreintes d'adhésif permettrait de valider leur implication respective dans l'adhésion de la larve pédivéligère de *C. gigas*. La localisation de ces protéines permettrait également de définir les interactions et les liaisons impliquées dans la structure de cet adhésif. Ces résultats se basent cependant sur l'expression des gènes et ne reflètent pas parfaitement la réalité protéique de l'adhésif. En effet, malgré les précautions prises dans le protocole de sélection des séquences (fenêtre de temps resserrées autour du stade pédivéligère), les mécanismes régulateurs entre l'ARNm et la translation de celui-ci en protéine sont multiples. Il est donc complexe d'établir un lien fiable entre la présence d'une quantité d'ARNm à un temps donné et la synthèse de protéines correspondantes dans les minutes ou les heures suivantes, notamment lors des phases de développement biologique. Afin d'identifier formellement la composition de l'adhésif, une analyse protéomique est donc indispensable. Cette analyse pourra être confortée par les résultats de ce chapitre, permettant de discuter de la pertinence des résultats obtenus.

CHAPITRE V

Etude des protéines intervenant dans l'adhésion de la larve pédivéligère de *Crassostrea gigas*.

1 Introduction

L'ensemble des bioadhésifs marins d'origine animale qui ont été étudiés ont révélé une composition majoritairement protéique (Hennebert *et al.*, 2014a). Par exemple, chez les moules, le byssus sécrété par le pied est très majoritairement composé de protéines de type collagène (90%) et de protéines spécifiques, appelées *mussel foot protein* (Waite, 2017). Parmi les quelques études menées chez les larves pédivéligères de mollusques bivalves, des marquages histochimiques ont également mis en évidence une nature protéique de l'adhésif sécrété à ce stade (Cranfield, 1975; Gruffydd *et al.*, 1975; Lane and Nott, 1975) (Chapitre III). Deux études plus récentes menées sur les larves pédivéligères de *Perna canaliculus* décrivent une nature protéique de l'adhésif (Petroni *et al.*, 2008, 2009). Dans notre étude chez *Crassostrea gigas*, les observations menées sur la glande C de la larve pédivéligère et sur les empreintes de l'adhésif sécrété (colorations histochimiques, spectroscopie FTIR), ont mis en évidence une composition majoritairement protéique de l'adhésif (Chapitre III). Afin de déterminer la composition précise de cet adhésif, une identification des protéines qui le compose est nécessaire.

Plusieurs méthodes d'identification des protéines existent, néanmoins, toutes ont en commun une étape de solubilisation des protéines d'intérêt dans un tampon. Cette solubilisation est généralement suivie d'une séparation des protéines en fonction de leur charge et/ou de leur poids moléculaire et enfin, d'une digestion par une enzyme des protéines en peptides, pour permettre leur identification par spectrométrie de masse.

Dans le domaine des bioadhésifs, les analyses protéomiques se heurtent généralement à la première étape, à savoir, la solubilisation dans un tampon. En effet, les bioadhésifs présentent généralement dans leur composition des acides aminés fortement hydrophobes et une forte insolubilité, rendant leur extraction difficile. L'utilisation de tampons d'extraction agressifs a permis de solubiliser partiellement certains bioadhésifs et ainsi d'identifier en partie leur composition protéique. Chez *M. edulis*, la première analyse protéique du byssus a été réalisée après hydrolyse acide de plaques byssales, permettant de déterminer la composition en acides aminés de cet adhésif et de mettre en évidence la présence de L-DOPA (Waite and Tanzer, 1980). Chez les balanes, des tampons d'extraction à base de chlorure de guanidine, un agent dénaturant des protéines, ont été utilisés (Kamino *et al.*, 2000). La solubilisation des empreintes d'adhésifs d'étoile de mer a également été permise par l'utilisation de tampons d'extraction protéique à base de chlorure de guanidine (Hennebert *et al.*, 2012b). Néanmoins ces méthodes aboutissent à une solubilisation partielle de l'adhésif, ne permettant pas l'identification de l'ensemble des séquences protéiques présentes.

Une alternative à la résistance des matrices bioadhésives est de cibler les protéines dites précurseurs, avant sécrétion, dans les glandes. Cette méthode a été utilisée chez les moules, permettant

notamment d'identifier les phénol-oxydases, présentes au sein de la glande phénolique du pied et responsables de la synthèse de la DOPA à partir des « *mussel foot protein* » riches en tyrosine (Waite, 1983). L'analyse protéique des glandes adhésives a également été réalisée chez le polychète *Phragmatopoma californica* (Waite *et al.*, 1992).

Cette analyse est compliquée pour les stades larvaires, du fait de leur petite taille. A ce jour, seulement deux protéines issues d'un bioadhésif sécrété par une larve d'organisme marin ont été identifiées, chez la larve *cypris* de balane (Dreanno *et al.*, 2006a; He *et al.*, 2018a). La *cypris* est le stade larvaire le plus étudié pour ses capacités d'adhésion (Aldred and Clare, 2008; Aldred and Petrone, 2016; Aldred *et al.*, 2011, 2013a, 2013b, Gohad *et al.*, 2012, 2014). Cependant, ces deux protéines présentes dans son adhésif ont été identifiées à partir d'une détection préalable chez l'adulte (Dreanno *et al.*, 2006a; He *et al.*, 2018a). Le nombre d'études s'intéressant aux « bioadhésifs larvaires » en milieu marin est relativement faible (larve *cypris* de balane, et larve pédivéligère de mollusques bivalves (Aldred and Petrone, 2016; Petrone *et al.*, 2008, 2009)) comparé aux études sur les bioadhésifs sécrétés par les organismes au stade adulte, plus facilement réalisables. En effet, l'étude des bioadhésifs larvaires implique la maîtrise de leur cycle de vie et de leur reproduction et ne permet de récupérer qu'une faible quantité de sécrétion. Chez l'espèce *O. edulis*, le volume d'adhésif produit chez la larve pédivéligère a été estimé entre 80 et 140pL (Cranfield, 1975). Chez la larve pédivéligère de *C. gigas*, outre la résistance du bioadhésif, la quantité produite par individu est également très faible.

Dans le Chapitre IV, une étude comparative *in silico* du transcriptome de *C. gigas* à différents stades de vie nous a permis de proposer un mécanisme hypothétique d'interactions moléculaires présentes au sein de l'adhésif. L'identification directe des protéines est néanmoins nécessaire afin de valider ou d'invalider le modèle proposé. Dans le but d'isoler et d'identifier les protéines composant l'adhésif sécrété par la larve pédivéligère de *C. gigas*, plusieurs méthodologies ont été employées :

1. Une approche ciblée sur la glande C de la larve pédivéligère, prélevée par microdissection laser.
2. Une approche comparative, menée sur des larves entières au stade véligère et pédivéligère.
3. Une approche ciblée sur les empreintes d'adhésif, après décollement des larves.

2 Protéomique ciblée de la glande C de *Crassostrea gigas*

La capture par microdissection laser est une technique de prélèvement d'échantillons en microscopie, permettant de disséquer très précisément un échantillon biologique. Ainsi, une zone minimale d'environ 5µm de diamètre peut être prélevée, permettant d'obtenir un échantillon de tissu très spécifique sur le plan cellulaire. Cette technique innovante est utilisée pour prélever des échantillons destinés des analyses de type « omics » (transcriptomiques, protéomiques) (Craven and Banks, 2001). L'analyse de protéines sur des prélèvements par microdissection laser a été réalisée avec succès sur des cellules cancéreuses (Ai *et al.*, 2006; Michael *et al.*, 2017; Ostasiewicz and Wiśniewski, 2017).

La majorité des protéines bioadhésives marines ont été identifiées par prélèvement de la glande sécrétrice, permettant ainsi de cibler les protéines dites précurseurs (Waite and Tanzer, 1980; Waite *et al.*, 1992). Ces protéines, qui n'ont pas encore été sécrétées, n'ont pas subi de réticulation, permettant la résistance de l'adhésif et sont donc plus sensibles à l'extraction protéique. Chez la larve pédivéligère de *C. gigas*, la taille de l'organisme, la présence de la coquille, l'élasticité des tissus, rendent impossible une dissection de la glande C du pied par une méthode classique. Afin d'obtenir un échantillon très spécifique de glande C de larve pédivéligère de *C. gigas*, des captures par microdissection laser ont été réalisées dans le but d'effectuer une analyse protéomique ciblant les protéines précurseurs localisées dans cette glande et constituantes de l'adhésif.

Une extraction protéique a été effectuée sur trois répliquats d'environ 1mm² de glande C. Après analyse par nanoLC MS/MS, aucun peptide n'a été détecté dans les 3 répliquats d'analyse. Cette absence de détection de peptide peut être expliquée par la quantité de tissu analysé (3,2mm² au total par 10µm d'épaisseur), probablement trop faible pour une analyse protéomique. En effet, les analyses courantes menées en protéomiques à partir de captures par microdissection laser ont été réalisées sur une surface de minimum 10 à 20mm² (Ostasiewicz and Wiśniewski, 2017). De plus, la présence de coquille chez les larves d'huître pédivéligères complique l'analyse, en ajoutant notamment une étape de décalcification et nécessitant la fixation des larves. Malgré l'utilisation d'un kit d'extraction protéique spécifique (QProteome FFPE Tissue Kit), la fixation à base de formol et l'inclusion en paraffine diminuent l'efficacité et la qualité des extractions protéiques.

Pour contourner ces difficultés, deux améliorations principales pourraient être envisagées. Premièrement, une analyse similaire pourrait être effectuée sur une quantité plus importante de tissu, en effectuant plus de captures par microdissection laser. En second lieu, il pourrait également être profitable de mettre en place un protocole de cryosections, permettant de s'affranchir des étapes de fixation, de décalcification et d'inclusion en paraffine, permettant *in fine* une meilleure extraction des protéines. Face à l'absence de résultats obtenus par cette méthode de microdissection laser, une

approche alternative a été envisagée : l'analyse protéomique comparative de larves entières à différents stades. Cette approche permettant notamment de disposer de suffisamment de matériel protéique pour une analyse protéomique globale.

3 Protéomique comparative de larves entières de *C. gigas*

Dans le but d'extraire une quantité de protéines plus importante, une analyse protéomique sur des larves entières a été réalisée. Cette méthode présente l'inconvénient d'être moins spécifique, puisque l'ensemble des tissus des larves sont traités. Cependant, afin d'identifier des protéines impliquées dans l'adhésion, une comparaison de stade, avec ou sans pied, a été effectuée. L'adhésif étant produit par les glandes localisées dans le pied, les protéines adhésives devraient être détectées dans l'analyse des larves pédivéligères, et absentes chez les larves au stade véligère. Ainsi, l'analyse protéomique comparative a été réalisée sur des larves entières âgées respectivement de 9, 14 et 15 jours post-fécondation. Ces trois échantillons permettent de comparer des larves véligères (J9), ne présentant pas de pied, et des larves pédivéligères (J14 et J15) présentant un pied formé et fonctionnel.

Tous réplicats confondus, 977 peptides ont été identifiés. Les protéines détectées uniquement au stade pédivéligère (échantillons J14 et J15), c'est-à-dire non présentes dans l'échantillon J9 et présentant un PSMs (nombre de spectre détecté par peptide) supérieur à 1 ont été sélectionnées. Parmi les 213 protéines ainsi sélectionnées, la majorité sont des séquences typiquement cellulaires : protéines nucléaires, ribosomes, protéines chaperonnes, métabolisme énergétique, transmission de signaux cellulaires, protéines de structure du cytosquelette, protéines musculaires. Les protéines structurelles (*annexin, dynein, filamin, myosin, tubulin*), ainsi que les protéines apparentées à l'énergie cellulaire (*phosphoenolpyruvate carboxykinase, succinate dehydrogenase*) peuvent être impliquées dans la formation des cils présents autour du pied de la larve pédivéligère. Malgré l'importance du pied dans l'adhésion de la larve pédivéligère, ces protéines n'ont probablement pas un rôle dans la structure de l'adhésif.

En se basant sur l'annotation fonctionnelle, 34 protéines présentant un rôle direct ou indirect dans l'adhésion ont été sélectionnées (Tableau 4). Certaines de ces protéines (*calmodulin, tenascin-R, EF-hand calcium binding protein, protocadherin Fat 4, EF-hand protein, collagen, perlucin like protein*) correspondent à des gènes spécifiquement exprimés au stade pédivéligère, sélectionnés dans le Chapitre IV.

Tableau 4 : Liste de protéines détectées chez des larves de *Crassostrea gigas* à J14 et J15 post-fécondation, ayant un rôle potentiel direct ou indirect dans l'adhésion. Les séquences ont été groupées par fonctions cellulaires potentielles. La colonne Loc. Cell. indique la localisation subcellulaire prédite de la séquence par le programme DeepLoc 1.0. Ext : extracellulaire, Cyt : cytoplasme, Lys : lysosome, Mit : mitochondrie, Pla : plaste, Pe : peroxyosome, Mem : membrane cellulaire, ER : réticulum endoplasmique, Nuc : noyau, Gol : appareil de Golgi.

Groupe	Gène ID	Protéine ID	Nom	Loc. Cell.
Processus d'oxido-réduction	CGI_10017958	XP_011426932	superoxide dismutase [Cu-Zn]-like isoform X1	Cyt 0.52
	CGI_10022007	EKC33515	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Nuc 0.86
	CGI_10021866	XP_011438224	omega-crystallin-like	Cyt 0.80
	CGI_10014226	EKC36754.1	hypothetical protein CGI_10014226	Per 0.41
	CGI_10005226	EKC27394.1	Protein iolS	Mit 0.62
Développement neuronal	CGI_10005609	XP_019918535.1	abnormal spindle-like microcephaly-associated protein homolog isoform X1	Cyt 0.66
	CGI_10021644	XP_011424970.1	neural cell adhesion molecule 1-like isoform X1	Mem 0.99
	CGI_10016296	XP_011448490	Tenascin-R	Ex. 0.99
	CGI_10001126	EKC22941.1	Annexin B9	Nuc 0.47
	CGI_10019493	EKC37876.1	Annexin A7	Cyt 0.57
Transport, biosynthèse	CGI_10006837	XP_011424081.1	putative Rab-43-like protein	Gol 0.82
	CGI_10027262	XP_011442206.1	putative Ras-related protein Rab-33	Gol 0.79
	CGI_10018074	XP_011443583.1	ras-related protein Rab-14	Gol 0.79
	CGI_10012278	XP_019926952.1	ras-related protein Rab-26 isoform X5	Gol 0.81
	CGI_10027260	XP_011442203.1	ras-related protein Rab-30-like	Gol 0.81
	CGI_10016388	XP_011439935.1	ras-related protein Rab-39B-like	Gol 0.78
	CGI_10021960	XP_011413950.1	ras-related protein Rab-3-like isoform X1	Gol 0.80
	CGI_10025353	EKC39800.1	Ras-related protein Rab-4B	Gol 0.66
	CGI_10018088	XP_011443599.1	ras-related protein Rab6 isoform X1	Gol 0.92
	CGI_10012406	XP_019923367.1	ras-related protein Rab-8A isoform X2	Gol 0.69
	CGI_10027458	XP_011444269.1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like	ER 0.57
	CGI_10018985	XP_011419089.1	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF2-like isoform X1	Mem 0.33
Mucus et structures fibreuses	CGI_10022619	XP_019922175.1	mucin-16 isoform X8	N.A.
	CGI_10022005	XP_011425751.2	collagen alpha-1(XII) chain	Ext 0.77
Protéines de la calcification et fixatrices de calcium	CGI_10010615	EKC18891.1	Aggrecan core protein	Ext 0.55
	CGI_10006917	EKC42164.1	Asialoglycoprotein receptor 2	Ext 0.99
	CGI_10006920	EKC42166.1	C-type mannose receptor 2	Ext 0.90
	CGI_10006922	XP_011414652	perlucin-like protein	Ext 0.99
	CGI_10014601	EKC29292.1	EF-hand calcium-binding	Pla 0.40
	CGI_10027457	EKC29242.1	Calmodulin	Cyt 0.38
CGI_10006482	EKC20234.1	Calmodulin	Cyt 0.67	

	CGI_10011293	EKC24243.1	Calmodulin	Cyt 0.82
	CGI_10006479	XP_019925474.1	calmodulin isoform X2	Cyt 0.71
	CGI_10011029	EKC18771.1	Protocadherin Fat 4	N.A.

3.1 Protéines potentiellement indirectement impliquées dans l'adhésion

3.1.1 Protéines de la tâche oculaire

Des oxydoréductases, NADP dépendantes, ont été détectées chez les larves pédivéligères : une *hypothetical protein* (EKC36754), une protéine iOIs (EKC27394) et une *omega-crystallin like* (XP_011438224). Ces protéines oxydo-réductrices sont potentiellement issues du métabolisme cellulaire mais peuvent également intervenir indirectement dans l'adhésion de la larve, en étant impliquées dans le comportement larvaire. Par exemple, la protéine *omega crystallin like*, qui fait partie de la famille des aldéhydes déshydrogénases, a été décrite chez les céphalopodes comme protéine structurale de l'œil et est présente dans les organes photosensibles de la coquille Saint-Jacques (Piatigorsky *et al.*, 2000). Chez *C. gigas*, le stade pédivéligère est également marqué par le développement de la tâche oculaire, organe photosensible permettant probablement à la larve de s'orienter lors de l'adhésion (Bayne, 2017). La séquence EKC36754 présente deux domaines Aldo/keto réductase NADPH dépendant. La séquence EKC27394 présente également ce type de domaine. Cette famille de protéines inclut de nombreuses protéines impliquées dans de multiples processus biologiques, dont la sensibilité à la lumière telle que la protéine *rho crystallin* (Jez and Penning, 2001; Roll *et al.*, 1995). Les annexines ont été détectées (EKC22941.1, EKC37876.1). Des annexines ont été identifiées dans le développement du système nerveux photo-sensitif des gastéropodes *Aplysia* et *Helix* (Kerschbaum *et al.*, 1997). **Il est donc probable que ces protéines interviennent au stade pédivéligère dans la perception de l'environnement par la lumière et participent ainsi indirectement à l'adhésion.**

3.1.2 Protéines impliquées dans le développement neuronal et la transmission de signaux

Il est intéressant de noter que les protéines relatives à la prolifération du système nerveux, telles qu'une protéine d'adhésion neuronale (XP_011424970.1) et une protéine ASMP (*abnormal spindle-like microcephaly-associated protein*) (XP_019918535.1) ont été détectées uniquement chez les larves pédivéligères. La présence de ces protéines, impliquées dans la neurogenèse, peut être en lien avec le développement du système nerveux du pied. La Tenascin-R (XP_011448490), qui présente un domaine Fibrinogène, peut être également impliquée dans le développement neuronal (Anlar and Gunel-Ozcan, 2012). La séquence XP_011424970.1, présentant 5 domaines immunoglobuline et 2 domaines fibronectine de type III, a été identifiée. Ce type de structures protéiques a été décrit comme

participant au maintien de structures synaptiques (Schachner, 1997). La protocadhérine FAT 4 (EKC18771.1), contenant 56 domaines cadhérine fixateurs de calcium, est probablement impliquée dans le développement neuronal (Albertin *et al.*, 2015). Les deux annexines (EKC22941.1, EKC37876.1) peuvent être impliquées dans divers processus cellulaires, dont le développement de cellules nerveuses (Kerschbaum *et al.*, 1997).

Le pied est un organe sensitif dont l'un des rôles lors de l'adhésion est le choix du substrat. L'apparition des ganglions pédieux a été localisée chez *C. gigas* dès le stade véligère, 4 jours post-fécondation par Yurchenko *et al.* (2018). L'innervation du pied, par le développement neuronal, se fait ensuite lors de sa morphogenèse au stade pédivéligère. Chez les larves pédivéligères de mollusques bivalves, la transmission de signaux chimiques neuromédiateurs (catécholamine, épinéphrine) joue un rôle majeur dans l'initiation du comportement de *crawling*, dans l'adhésion et dans l'entrée en métamorphose (Bonar *et al.*, 1990; Young *et al.*, 2015). Il a également été montré que la présence de glycoprotéines localisées dans la matrice protéique de la coquille d'huîtres adultes induisait l'adhésion des larves d'huître (Vasquez *et al.*, 2013), impliquant donc un mécanisme de reconnaissance chez la larve et une transmission du signal par le système nerveux. De plus, un régulateur d'échange d'ion Na^+/H^+ a été identifié (XP_011419089.1). Ce régulateur a été décrit comme interagissant avec les récepteurs adrénergiques (Hall *et al.*, 1998). La séquence 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygénase (EKC33515), qui catalyse l'oxydation du 4-hydroxyphenylpyruvate, un catabolite de la tyrosine et de la phénylalanine, pourrait également être impliquée dans la transmission des signaux d'adhésion.

Enfin, les protéines fixatrices de calcium comme les 4 calmodulines (EKC29242, EKC20234, EKC24243, XP_019925474.1) pourraient réguler certains canaux potassium (Gonçalves and Stühmer, 2010; Schumacher *et al.*, 2001). Le potassium joue un rôle dans l'adhésion de la larve pédivéligère de *C. gigas*, sans que les processus cellulaires précis ne soient bien compris (Wang *et al.*, 2015b). Ainsi, il est possible que ces protéines soient impliquées dans la transmission de stimuli externes lors de l'adhésion.

L'ensemble des protéines impliquées dans le développement neuronal et la transmission nerveuse sont en relation indirecte avec l'adhésion chez la larve pédivéligère de *C. gigas*, intervenant lors du *crawling* pour le choix du site d'adhésion.

3.1.3 Protéines potentiellement impliquées dans la synthèse et la sécrétion de l'adhésif

Un ensemble de protéines Rab (famille de protéine G) a été identifié (XP_011424081.1, XP_011442206.1, XP_011443583.1, XP_019926952.1, XP_011442203.1, XP_011439935.1, XP_011413950.1, EKC39800.1, XP_011443599.1, XP_019923367.1). Ces protéines cellulaires sont localisées au niveau des membranes de l'appareil de Golgi (Chiu *et al.*, 2002). Elles sont impliquées

dans le transport vésiculaire, permettant l'indexation des vésicules aux différents compartiments cellulaires et la régulation des processus de sécrétion. Il a par ailleurs été observé au sein des cellules de la glande C du pied, un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi très développés et volumineux, permettant la synthèse de l'adhésif sous forme de vésicules (Chapitre III).

La peptidyl prolyl cis-trans isomérase (XP_011444269), qui intervient dans la mise en conformation des protéines, peut également être liée à la biosynthèse des protéines adhésives, probablement localisée dans le réticulum endoplasmique. Des protéines *Ras-related* et une peptidyl prolyl cis-trans isomérase ont été identifiées dans l'extrémité des *podia* d'oursin *Paracentrotus lividus* intervenant dans la sécrétion et la biosynthèse des protéines adhésives (Lebesgue *et al.*, 2016).

Il est donc probable que ces protéines cellulaires, non détectées au stade véligère, puissent provenir du pied et participer à la l'adhésion à différents niveaux : lors de la biosynthèse de l'adhésif par les cellules des différentes glandes, lors de son stockage sous forme de granules et lors de sa sécrétion.

3.2 Protéines potentiellement impliquées dans la structure des sécrétions adhésives

3.2.1 Protéine de type mucine

Une mucine (XP_019922175.1) a été identifiée par un peptide qui peut également correspondre à un groupe de 9 isoformes codés par le même gène CGI_10022619. Les mucines sont des protéines glycosylées constituant du mucus (Davies and Hawkins, 1998). Il est probable que des mucines entrent dans la composition des sécrétions adhésives réversibles lors du *crawling* de *C. gigas*. En effet, nous avons observé que les glandes B, ainsi que certaines glandes du groupe D présentent un contenu riche en polysaccharides et/ou protéines glycosylées (Chapitre III). Ces glandes interviennent lors de la phase de *crawling*, sécrétant un adhésif réversible qui pourrait être apparenté à un mucus. Cependant, chez les mollusques, le mucus est une substance omniprésente à la surface de nombreux organes (manteau, palpes labiaux, branchies, appareil digestif) (Davies and Hawkins, 1998). L'implication de cette protéine dans l'adhésion lors de la phase de *crawling* est donc très hypothétique.

3.2.2 Protéine oxydo-réductrice

Une enzyme superoxyde dismutase (SOD) (XP_011426932), a été identifiée chez les larves pédivéligères de *C. gigas*. Cette séquence présente 55% d'homologie avec la *byssal superoxide dismutase-1* (AKI87983.1) identifiée dans le filament et la plaque byssale de *M. coruscus* (Qin *et al.*, 2016). Chez *P. fucata*, une étude a révélé la présence de SOD ayant un rôle de protection probable au niveau du byssus (Liu *et al.*, 2015).

Il est possible que cette enzyme participe aussi à la protection de l'adhésif chez *C. gigas*. Elle pourrait également participer aux réactions d'oxydo-réduction impliquées dans l'adhésion.

3.2.3 Protéine contenant un domaine lectine de type C

Un groupe de protéines détectées lors de cette étude correspond à des gènes sélectionnés dans le chapitre IV, spécifiquement exprimés au stade pédivéligère (CGI_10010615, CGI_10006917, CHI_10006920, CGI_10006922). Ces protéines, présentant un domaine lectine de type C, sont apparentées à des perlucines. Nous avons vu dans le chapitre IV que ces protéines ont une homologie de séquence avec la *foot protein 1* (AIWO4139) identifiées chez *Atrina pectinata* (Yoo *et al.*, 2016a). Dans notre analyse, ces séquences sont parmi les plus abondantes dans le groupe J15 (larves pédivéligères 15 jours post-fécondation). Parmi ces protéines, il est intéressant de noter que le gène CGI_10100615 code pour deux protéines *Aggrecan core* très similaires, dont la seule différence est la présence d'un peptide signal pour la séquence XP_011433913 contrairement à la séquence EKC18891. 9 PSMs ont été identifiés pour ces séquences, avec un score Sequest HT de 18,5.

Ce groupe de protéines présente des caractéristiques indiquant une implication probable dans l'adhésion de *C. gigas*.

3.2.4 Protéine de type collagène

Enfin, une séquence de collagène XII alpha 1 a été identifiée (XP_011425751.2) codée par le gène CGI_10022005. Ce gène n'avait pas été sélectionné comme spécifique du stade pédivéligère (chapitre IV). Cependant, d'autres gènes codant pour des collagènes avaient été identifiés comme spécifiquement exprimés au stade pédivéligère (CGI_10010827, CGI_10010374, CGI_10010375, CGI_10011175). Cette séquence longue de 963 acides aminés est probablement extracellulaire selon le programme DeepLoc 1.0. Elle présente 4 domaines von Willebrand Factor de type A (position 35-205, 396-560, 581-754, 784-904), ainsi que des motifs *metal ion dependent adhesion site* (MIDAS). Le domaine vWF-A est spécifique de protéines de la matrice extracellulaire et a été rapporté chez des protéines adhésives d'organismes marins (Hennebert *et al.*, 2014b; Smith *et al.*, 2017; Yoo *et al.*, 2016b), dans la *proximal thread matrix protein 1* (PTMP-1) (AAL17974.1) présente dans le byssus de *Mytilus galloprovincialis* (Suhre *et al.*, 2014), ainsi que dans la *thrombospondin 1* (ALK82317.1) présente dans la partie distale du byssus de *Pinctada fucata* (Liu *et al.*, 2015). Ces deux dernières protéines, localisées dans le filament des byssus présentent également des domaines de type MIDAS permettant la liaison à des ions métalliques. Le pI de la séquence XP_011425751.2 est très proche de celui de la séquence AAL17974.1 (5,4 et 5,9). Après analyse par le programme Phyre2, cette séquence présente 24% d'identité structurale (couverture de 38%, score de confiance de 100%) avec la protéine *proximal thread matrix protein 1* (AAL17974.1) (Figure 31).

L'ensemble des analyses concernant cette séquence de collagène XII alpha 1 indiquent qu'il est très probable que cette protéine entre dans la composition de l'adhésif sécrété par *C. gigas* et participe à la structure fibreuse de celui-ci.

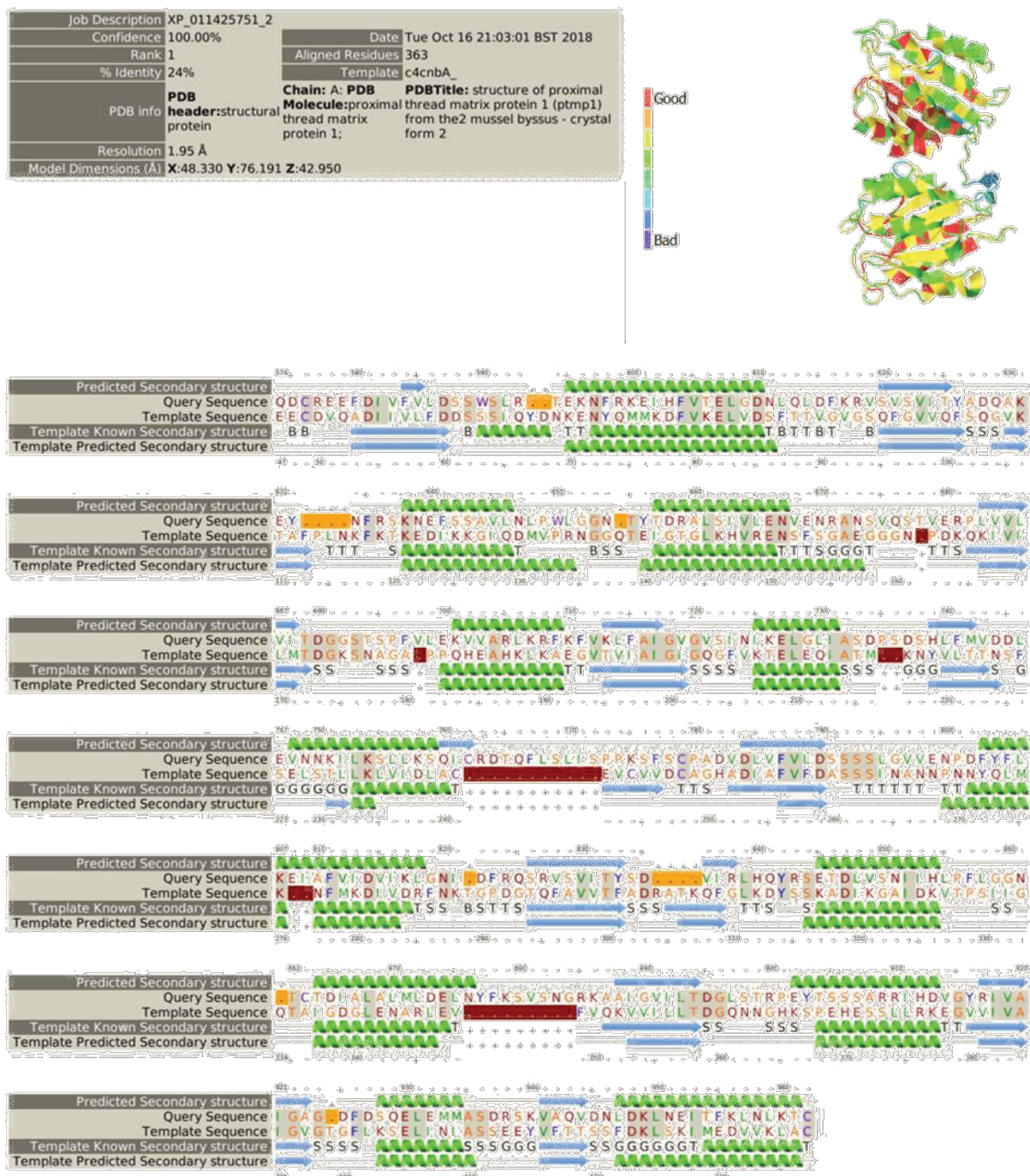


Figure 31 : Alignement entre les séquences protéiques de collagène XII alpha 1 de *C. gigas* (XP_011425751.2) et la proximal thread matrix protein 1 de *M. galloprovincialis* (AAL17974.1). Confiance de l'alignement : fiabilité de l'alignement du modèle de requête par paire, identifiée par HHsearch. Les valeurs de confiance sont obtenues à partir des probabilités postérieures calculées dans l'algorithme Forward-Backward selon le programme Phyre2

(Kelley *et al.*, 2015). Orange : délétion relative à la séquence modèle (PTMP1), Marron : insertion relative à la séquence modèle.

3.3 Représentations des rôles hypothétiques des protéines détectées

L'analyse comparative présente l'avantage de disposer d'une quantité de matériel biologique conséquent. Ceci a permis d'identifier des protéines cellulaires, probablement impliquées dans le développement du pied (Figure 32). Des protéines relatives au système nerveux ont été identifiées. Ces protéines sont probablement impliquées dans la transmission des signaux externes permettant l'orientation de la larve lors du *crawling* (tâche océlaire) et le déclenchement de l'adhésion. Des gènes codant pour des isoformes de certaines de ces protéines avaient été sélectionnés dans le Chapitre IV pour leur expression spécifique au stade pédivéligère (ténascine-R, calmoduline). Des protéines probablement impliquées dans la synthèse de l'adhésif et les modifications post-traductionnelles des protéines adhésives ont également été mises en évidence (Figure 32). Ces protéines interviendraient probablement dans les différentes glandes adhésives du pied, au niveau des cellules sécrétrices. Enfin, la présence de protéine extracellulaire, telle que la mucine, pourrait indiquer un rôle lors de l'adhésion réversible du pied.

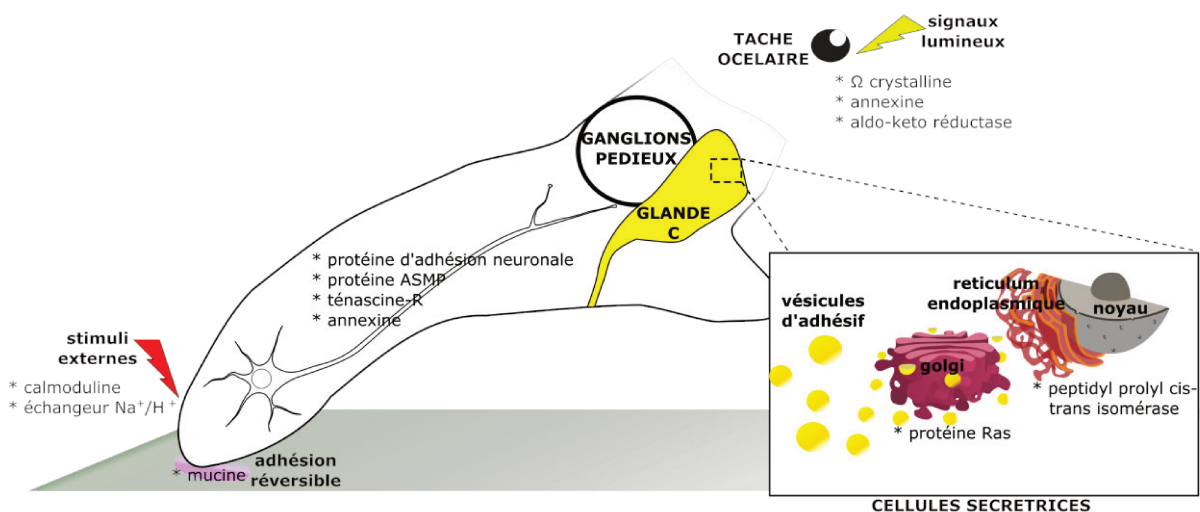


Figure 32 : Représentation schématique des processus cellulaires du pied et de la tâche océlaire intervenant indirectement dans l'adhésion de la larve pédivéligère de *C. gigas*. Les noms des protéines identifiées lors de l'analyse protéomique comparative entre des larves au stade véligère et des larves au stade pédivéligère intervenant probablement dans ces processus sont identifiées par une étoile.

Concernant la nature de l'adhésif, l'analyse comparative a également permis d'identifier des protéines similaires à des gènes sélectionnés dans le chapitre IV (*calmodulin*, *tenascin-R*, *EF-hand calcium binding protein*, *protocadherin Fat 4*, *collagen*, *perlucin like protein*). Ces protéines participent probablement à la structure de l'adhésif sécrété (Figure 33). Ainsi, malgré la possible implication de ces protéines dans les processus de calcification évoqués dans le chapitre IV, l'ensemble des séquences contenant

un domaine de fixation aux polysaccharides (*C-type lectin*) sont des candidats qui pourraient convenir à l'hypothèse d'une liaison entre le periostracum et l'adhésif.

D'autre part, il est très probable que les domaines de fixation du calcium présents dans certaines protéines détectées lors de cette étude, puissent permettre des liaisons ioniques au sein de l'adhésif. Des sites de liaison de cation métallique divalent (en particulier de calcium) ont été rapportés dans les protéines adhésives (Flammang *et al.*, 2009; Hennebert *et al.*, 2014b; Inoue *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2016). Dans le chapitre IV, des gènes potentiellement impliqués dans la chimie des tyrosines et de la DOPA avaient été identifiés (peroxydases, tyrosinases). Il est intéressant de noter qu'aucune protéine en lien avec la chimie de la DOPA n'a été détectée au cours de cette analyse.

Enfin, le collagène est probablement une protéine de structure des fibres adhésives. La séquence de collagène XII détectée lors de cette analyse présente des domaines et une prédiction de structure tridimensionnelle très intéressante. Comme suggéré dans le chapitre IV, la présence des domaines von Willebrand Factor de type A, permet probablement le maintien des fibres adhésives par liaison à des protéines de type collagène.

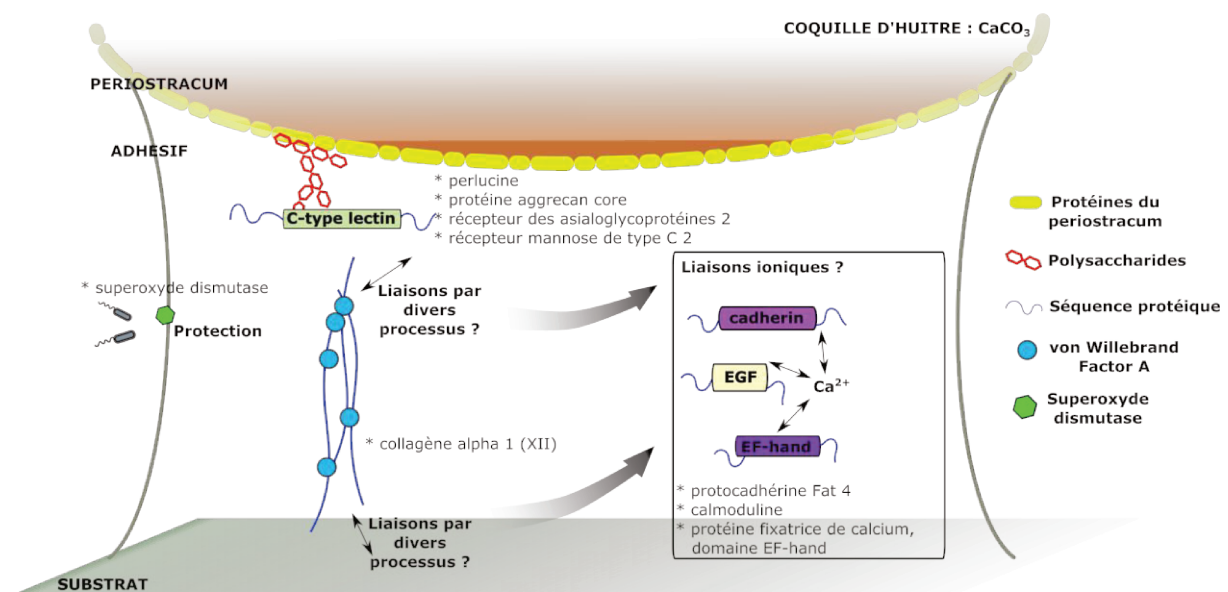


Figure 33 : Représentation schématique des processus moléculaires intervenant dans l'adhésion de la larve pédiviligère de *C. gigas*. Les noms des protéines identifiées lors de l'analyse protéomique comparative entre des larves au stade véligère et des larves au stade pédiviligère intervenant probablement dans ces processus sont annotés par une étoile.

Afin d'identifier plus précisément les protéines impliquées dans la structure de l'adhésif sécrété par la larve pédiviligère de *C. gigas*, une analyse protéique de l'adhésif sécrété est nécessaire. Elle permettrait de cibler directement l'adhésif, et ainsi d'analyser un échantillon théoriquement moins complexe qu'une larve entière. C'est pourquoi l'analyse protéique spécifique des empreintes d'adhésif a été réalisée.

4 Protéomique des empreintes d'adhésif de *C. gigas*


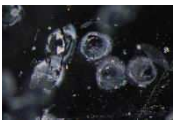


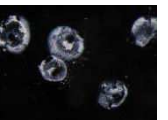
Une analyse protéomique a été menée sur les empreintes d'adhésif de *C. gigas* après décolllement des larves. Cette stratégie permet de cibler directement l'adhésif, dans le but d'identifier les séquences protéiques le composant. Ainsi, les protéines cellulaires, observées lors de l'analyse comparative ne devraient pas être présentes dans cette analyse, ce qui devrait permettre d'identifier plus aisément les protéines adhésives. L'utilisation de tampons d'extraction fortement dénaturant sur des adhésifs marins sécrétés a déjà permis d'identifier des protéines d'adhésion chez la moule (Waite *et al.*, 1989), la balane (Kamino *et al.*, 2000), et certains échinodermes (Hennebert *et al.*, 2012b; Santos *et al.*, 2009).

Plusieurs tampons d'extraction protéiques ont été testés afin de solubiliser et d'extraire les protéines des empreintes d'adhésif de *C. gigas*. Une autre méthode, inhabituelle, basée sur une digestion enzymatique directe des empreintes d'adhésif a également été réalisée.

4.1 Extractions protéiques

Cinq protocoles d'extraction protéique ont été testés sur les empreintes d'adhésif de *C. gigas* (Tableau 5). L'observation des empreintes sous loupe binoculaire après extraction ne montre aucun changement morphologique avant et après extraction (Tableau 5). Le dosage de protéines indique que les tampons d'extraction à base d'hydrochlorure de Guanidine sont peu efficaces (Tableau 5). Le tampon permettant d'extraire le plus de protéines est celui à base d'urée 8M, avec une concentration de $0,617\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de protéines.

Tableau 5 : Tests de tampons d'extraction protéique sur des empreintes d'adhésif de *Crassostrea gigas*.

Tampon d'extraction	Urée 8M, SDS 2%, Triton x-100 2%, CHAPS 2%, pH 4,3	NaOH 0,1M, EDTA 0,05M, SDS 2%, β -mercaptoéthanol 2%, pH 9,7	Tris-HCl 1,5M, guanidine hydrochloride 6M, EDTA 0,02M, DTT 0,5M, pH 8,5	Guanidine hydrochloride 2M, Hydroxylamine hydrochloride 2M, K_2CO_3 0,2M, pH 9	Tris-HCl 0,6M, SDS 2%, DTT 0,5M, pH 6,8
Condition d'extraction	1h 60°C	30min 90°C	1h 60°C	4h 45°C	3h 60°C
Observations après extraction					
Concentration en protéines ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0,617	0,2542	0,011	0,005	0,2537

Après migration 1D SDS PAGE des cinq extraits protéiques, la coloration au bleu de Coomassie n'a pas permis de visualiser des protéines. Les extraits protéiques ont donc été concentrés par filtration sur membrane 3kDa (Amicon Ultra 2). Un dosage de Bradford (Bradford, 1976) réalisé sur les deux fractions (filtrat et concentrat) a permis de détecter une coloration uniquement dans le concentrat, mettant ainsi en évidence que les extraits ont été dégradés en peptides d'une taille inférieure à 3kDa.

Il apparaît donc que les protocoles d'extraction agressifs utilisés, ont sans doute permis d'extraire les protéines présentes autour des empreintes (contaminants du substrat) mais les traitements agressifs les ont dégradées. Quant aux protéines présentes dans les empreintes d'adhésif, elles n'ont sans doute pas pu être solubilisées. L'absence de modification morphologique sur les empreintes conforte cette hypothèse (Tableau 5). Pour tenter d'y remédier, une digestion enzymatique directe des empreintes a été réalisée.

4.2 Digestion enzymatique des empreintes et analyse en spectrométrie de masse

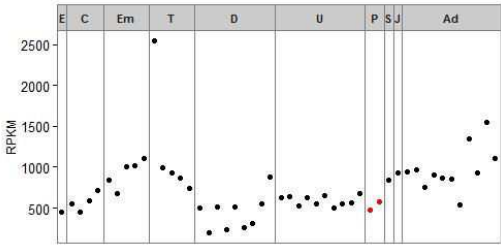
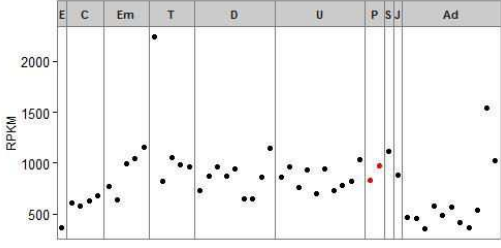
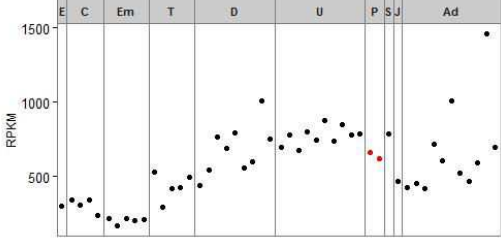
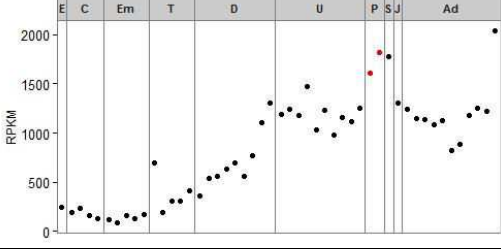
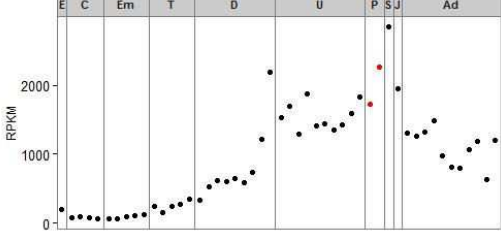
Après décollage de larves pédivéligères fixées depuis moins de 24h sur des lames de verre, les empreintes d'adhésif restantes ont été placées en présence de trypsine afin d'être digérées. Cette méthode a pour objectif de digérer les protéines présentes dans les empreintes d'adhésif de *C. gigas* sans extraction protéique préalable. Cette digestion enzymatique par la trypsine des empreintes d'adhésif, a ensuite été séparée par nanoLC et analysée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF/TOF). Dans les trois réplicats d'analyse, un ensemble de 328 protéines ont été identifiées. Quarante-deux protéines ont été mutuellement détectées dans les trois réplicats d'échantillons. L'annotation fonctionnelle des séquences a montré que 82% de ces protéines ont un domaine de liaison, 43% ont une activité catalytique et 20% présentent une activité moléculaire structurelle. Les profils d'expression des gènes codant pour ces protéines ont été analysés sur la base des données transcriptomiques publiées par Zhang *et al.* (2012). Tous les gènes correspondant aux protéines détectées sont exprimés au stade pédivéligère (Tableau 6-9). La majorité des protéines identifiées présentent après analyse par le programme DeepLoc 1.0 une localisation intracellulaire. Aucune des protéines détectées par cette méthode ne correspondent aux gènes sélectionnés dans le chapitre IV pour leur spécificité d'expression au stade pédivéligère.

4.2.1 Protéines de traduction et de transcription

Un quart des protéines détectées par l'analyse protéomique directe ont été annotées pour des fonctions cellulaires basales, comme la transcription de l'ADN ou la traduction de l'ARN, indiquant leur origine nucléaire ou cytoplasmique : *plasminogen activator inhibitor 1 RNA*, *staphylococcal nuclease domain-containing 1-like*, *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like isoform X2*, *elongation*

factor 1-alpha, elongation factor 2, 60S acidic ribosomal P0, 60 S ribosomal L5, 40S ribosomal S24 isoform X1 et partial histone H4 (Tableau 6).

Tableau 6 : Liste des protéines impliquées dans les processus de traduction et la transcription, identifiées après digestion tryptique des empreintes d'adhésif de *Crassostrea gigas*. La colonne Loc. Cell. indique la prédiction de localisation subcellulaire par le programme DeepLoc 1.0. Cyt : cytoplasme, Nuc : noyau.

Gène ID, Protéine ID	Nom	Loc. Cell.	Profil d'expression de gène (RPKM) par stade (E-U: Oeuf à larve, P: pédivéligère, S-J: après métamorphose, Ad: Adulte)
CGI_10028469 EKC41722	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2-like isoform X1	Cyt 0.37	
CGI_10020922 EKC23243	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B-like isoform X2	Cyt 0.56	
CGI_10028871 EKC42898	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding	Cyt 0.60	
CGI_10001493 EKC22774	40S ribosomal S24 isoform X1	Nuc 0.22	
CGI_10027192 EKC36296	60S ribosomal L5	Cyt 0.78	

CGI_10010682 EKC26031	60S acidic ribosomal P0	Cyt 0.91	
CGI_10026535 EKC40848	staphylococcal nuclease domain-containing 1-like	Cyt 0.89	
CGI_10012474 EKC33063	elongation factor 1-alpha	Cyt 0.91	
CGI_10001407 N.A.	elongation factor 2	N.A.	
CGI_10008056 EKC28010	histone H4- partial	Nuc 0.89	

Ces protéines ne proviennent probablement pas des empreintes d'adhésif, mais de résidus cellulaires du pied des larves, partiellement attachés au substrat lors de la phase de *crawling*, ou d'autres parties des larves, accidentellement détachées lors de la manipulation des substrats. La fonction du *plasminogen activator inhibitor 1 RNA* chez *C. gigas* n'est pas connue, mais cette protéine a un domaine spécifique de liaison nucléotidique indiquant un rôle potentiel dans la régulation de l'ARN ou sa stabilité. La *staphylococcal nuclease domain-containing 1-like* est un co-activateur de facteur de transcription. L'*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like isoform X2* est également connue comme facteur de transcription. L'*elongation factor* (EKC33063), peut agir comme un facteur de

transcription et pourrait être impliqué dans la régulation de la maturation des protéines. Des sous-unités ribosomales ont été détectées dans notre échantillon. Les ribosomes (EKC41722, EKC23243, EKC22774, EKC36296, EKC26031) sont directement impliqués dans la transcription de l'ARN pour la synthèse des protéines. Les histones (EKC28010) sont impliquées dans la structure de la chromatine. La présence de protéines impliquées dans la transcription de l'ADN et le traitement de l'ARN ne renseigne pas sur la composition de l'adhésif, mais indique une forte activité de transcription à ce stade larvaire, particulièrement au niveau du pied. Lors du stade pédivéligère, les glandes du pied synthétisent en quelques heures l'adhésif qui représente un volume conséquent de l'animal. À ce stade, cet organe est probablement l'un des plus actifs sur le plan de la transcription et de la traduction des gènes de l'adhésion. Plus généralement, au stade pédivéligère, la larve prépare également la métamorphose et synthétise les ARN et protéines nécessaires à l'initiation de celle-ci.

4.2.2 Protéines impliquées dans la biosynthèse des protéines

Des enzymes impliquées dans la synthèse des protéines et le cycle des glucides ont également été détectées : *phosphoenolpyruvate carboxykinase-like*, *disulfide isomerase and disulfide isomerase A3*, *fructose-bis-phosphate aldolase*, *aldolase*, *14-3-3 zeta/epsilon* et *peptidyl-prolyl cis trans isomerase-like* (Tableau 7).

Tableau 7 : Liste des protéines impliquées dans la biosynthèse des protéines, identifiées après digestion tryptique des empreintes d'adhésif de *Crassostrea gigas*. La colonne Loc. Cell. indique la prédiction de localisation subcellulaire par le programme DeepLoc 1.0. Cyt : cytoplasme, ER : réticulum endoplasmique.

Gène ID, Protéine ID	Nom	Loc. Cell.	Profil d'expression de gène (RPKM) par stade (E-U: Oeuf à larve, P: pédivéligère, S-J: après métamorphose, Ad: Adulte)
CGI_10024268 EKC29146	14-3-3 epsilon	Cyt 0.71	
CGI_10014966 EKC18103	14-3-3 zeta isoform X1	Cyt 0.64	

CGI_10026048 EKC29663	disulfide isomerase	ER 0.99	
CGI_10011652 EKC32832	disulfide-isomerase A3	ER 0.99	
CGI_10025180 N.A.	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like	N.A.	
CGI_10019801 EKC30386	Fructose-bisphosphate aldolase	Cyt 0.61	
CGI_10014916 EKC27095	phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]-like	Cyt 0.90	
CGI_10025556 EKC37976	Fructose-bisphosphate aldolase	Cyt 0.95	

La disulfide isomérase (EKC29663, EKC32832) située dans le réticulum endoplasmique, catalyse la formation des ponts disulfures et intervient dans la glycosylation des protéines. Une protéine identifiée comme disulfide isomérase, codée par un gène différent a également été identifiée au cours

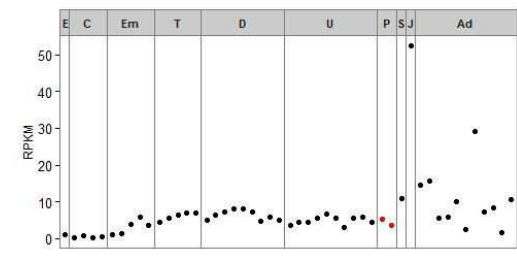
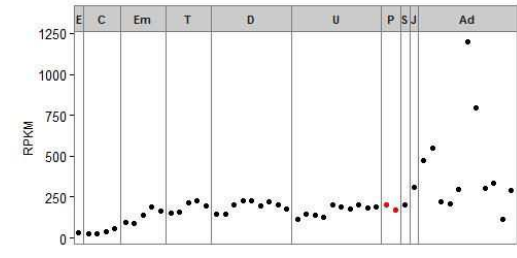
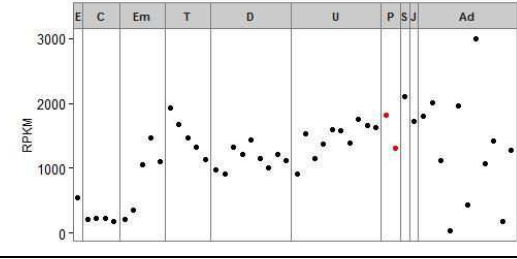
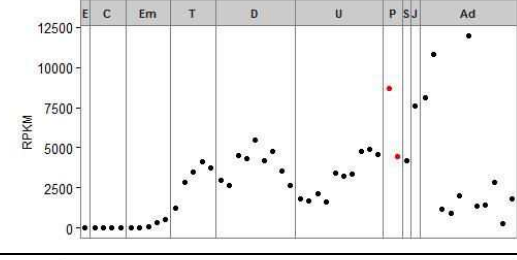
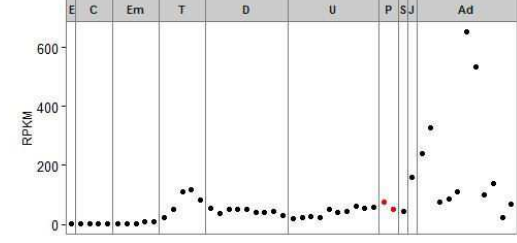
de l'analyse protéomique comparative chez les larves pédivéligères. Cette protéine a également été détectée dans le protéome des organes adhésifs de l'oursin *Paracentrus lividus* (Lebesgue *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2009). La présence de cette enzyme, impliquée dans les modifications post-traductionnelles des protéines, peut être liée à la détection de soufre dans l'adhésif de *C. gigas* (Chapitre III). La *fructose-bis-phosphate aldolase* (EKC30386, EKC37976) peut intervenir dans la signalisation cellulaire. Le pied est un organe sensitif, qui permet de détecter si le substrat est convenable pour l'adhésion. Des cellules sensibles sont donc présentes dans le pied, transmettant les signaux nerveux depuis l'extrémité du pied jusqu'aux ganglions pédieux situés à la base du pied. Les protéines 14-3-3 zêta / epsilon (EKC29146, EKC18103) sont des protéines de liaison impliquées dans les voies de transmission de signal et d'assemblage des protéines. La peptidyl-prolyl cis-trans isomérase (CGI_10025180) est une enzyme du réticulum endoplasmique qui se lie à des motifs spécifiques Ser/Thr-Pro phosphorylés (pSer/Thr-Pro), induisant des changements de conformation. Un isoforme de la peptidyl-prolyl cis-trans isomérase a été identifié chez les larves pédivéligères lors de l'analyse comparative (XP_011444269.1). Des protéines phosphorylées ont été rapportées dans l'adhésif de *Phragmatopoma californica* (Wang and Stewart, 2013). Par le biais d'une hausse de la valeur de pH lors de la sécrétion de l'adhésif au contact de l'eau de mer, les liaisons entre les phosphates et les cations métalliques (Ca^{2+}) passent d'interactions électrostatiques à des liaisons ioniques, de plus forte énergie, permettant une solidification rapide de l'adhésif. La présence de protéines phosphorylées dans l'adhésif de *C. gigas* est probable, la solidification rapide de l'adhésif observée lors de la sécrétion pouvant être due à un mécanisme similaire.

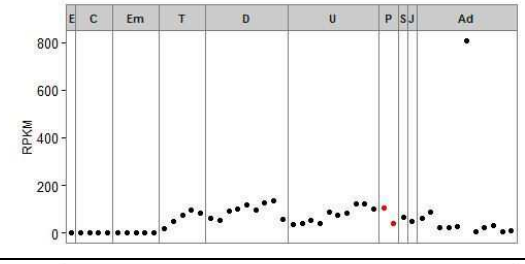
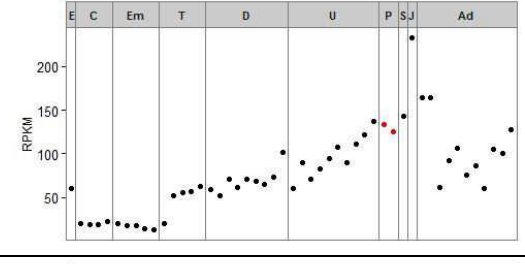
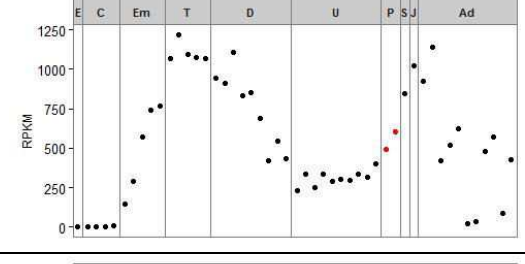
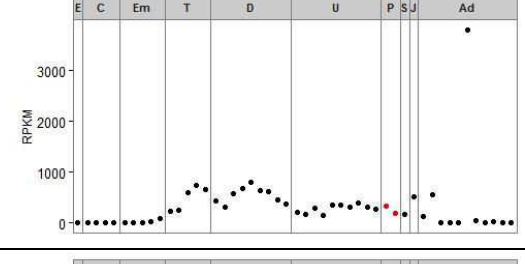
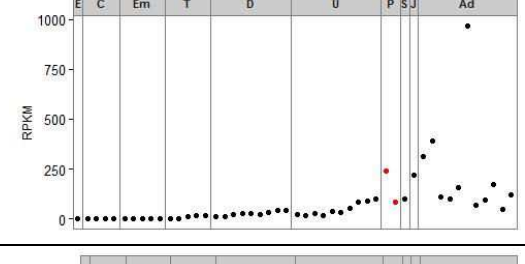
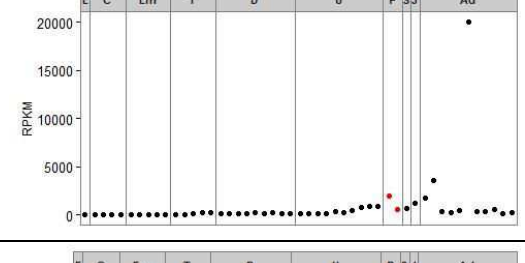
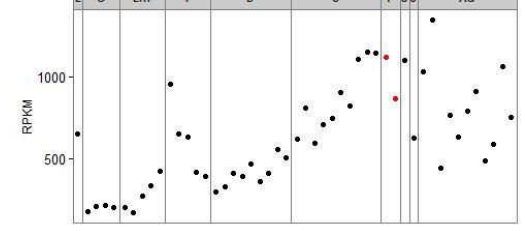
L'ensemble de ces protéines peuvent être impliquées dans la biosynthèse du bioadhésif, cependant, leur présence dans cette analyse, indique une contamination cellulaire du substrat, et ne révèle probablement pas la composition des empreintes d'adhésif.

4.2.3 Protéines de structure et du métabolisme énergétique

Des protéines constitutives des cellules musculaires ont également été détectées : isoforme X1 et X4 de la filamine A, myosine (probablement du muscle adducteur), actine A3a cytoplasmique, isoforme X1 de l'actine alpha-sarcomérique, isoforme X1 de la paramyosine, transcétolase, filament intermédiaire, tubuline chaîne alpha et bêta, isoforme de tropomyosine X6 et gelsoline (Tableau 8).

Tableau 8 : Liste des protéines musculaires et du métabolisme énergétique, identifiées après digestion tryptique des empreintes d'adhésif de *Crassostrea gigas*. La colonne Loc. Cell. indique la prédiction de localisation subcellulaire par le programme DeepLoc 1.0. Cyt : cytoplasme, ER : réticulum endoplasmique, Nuc : noyau, Ext : extracellulaire.

Gène ID, Protéine ID	Nom	Loc. Cell.	Profil d'expression de gène (RPKM) par stade (E-U: Oeuf à larve, P: pédivéligrère, S-J: après métamorphose, Ad: Adulte)
CGI_10017112 EKC38555	Actin	Cyt 0.38	
CGI_10003110 EKC43084	Actin alpha - sarcomeric-like isoform X1	Cyt 0.82	
CGI_10003491 EKC30048	Actin A3a cytoplasmic	Cyt 0.88	
CGI_10018876 EKC31894	Actin adductor muscle	Cyt 0.88	
CGI_10003521 EKC28512	filamin-A-like isoform X1	Cyt 0.92	

CGI_10012231 EKC40331	filamin-A-like isoform X4	Cyt 0.72	
CGI_10002689 EKC22157	gelsolin 2	Cyt 0.67	
CGI_10010873 EKC18758	Intermediate filament	Cyt 0.71	
CGI_10022093 EKC37566	Myosin	Cyt 0.92	
CGI_10025109 EKC39652	Myosin	Cyt 0.92	
CGI_10001653 EKC32205	paramyosin-like isoform X1	Cyt 0.61	
CGI_10024999 EKC31000	tubulin alpha-1A chain-like	Cyt 0.83	

<p>CGI_10012330 EKC30036 CGI_10010163 EKC25407 CGI_10019835 EKC35235</p>	<p>tubulin beta chain</p>	<p>Cyt 0.76 Cyt 0.75 Cyt 0.77</p>	
<p>CGI_10013163 EKC32773</p>	<p>tropomyosin isoform X6</p>	<p>Nuc 0.49</p>	
<p>CGI_10024887 EKC41048</p>	<p>Dynein heavy chain axonemal</p>	<p>Cyt 0.80</p>	
<p>CGI_10005339 EKC20785</p>	<p>echinoderm microtubule-associated -like 2 isoform X3</p>	<p>Cyt 0.77</p>	
<p>CGI_10006807 EKC29122</p>	<p>Sarcoplasmic calcium-binding</p>	<p>Cyt 0.56</p>	
<p>CGI_10028694 EKC40969</p>	<p>Transketolase 2</p>	<p>Cyt 0.62</p>	

CGI_10013347 EKC39411	ATP synthase subunit mitochondrial	Cyt 0.66	
CGI_10017621 EKC25687	heat shock 90	Cyt 0.91	
CGI_10024981 EKC30983	mammalian ependymin- related 1-like	Ext 0.54	
CGI_10021481 EKC24882	Arginine kinase	Cyt 0.87	
CGI_10015492 EKC33663	78 kDa glucose-regulated	ER 0.98	

Lors de la phase de *crawling*, les contractions du pied sont possibles par la présence de fibres musculaires, observées sur coupes histologiques (Chapitre III) et précédemment décrites chez les larves pédivéligères (Bayne, 2017). En outre, les protéines impliquées dans les voies énergétiques cellulaires pourraient provenir de l'activité musculaire du pied. Les protéines structurales, comme les filaments intermédiaires et les protéines impliquées dans la modification post-traductionnelle des protéines, telles que la peptidyl-prolyl-cis-trans-isomérase, pourraient être apparentées à la libération de l'adhésif sous forme de vésicules comme observés en MEB à l'extrémité du pied lors de la phase de *crawling* (Chapitre III).

Une approche protéomique similaire, menée sur les empreintes d'adhésif de l'oursin *P. lividus*, a mis en évidence la présence de protéines cellulaires et structurales provenant de tissus musculaires. Les protéines relatives au noyau telles que les histones ont également été détectées (Santos *et al.*, 2009, 2013). L'adhésion temporaire chez les oursins impliquerait la perte de cellules et de fragments d'épiderme sur le substrat pendant le détachement. Les observations en MEB des larves prélevées en phase de *crawling* montrent un écrasement des cils au niveau de la partie apicale du pied (Chapitre III). Cet écrasement résulte de la pression exercée par la larve lors du *crawling* et de l'adhésion temporaire de l'extrémité du pied. Il est probable que l'adhésion réversible du pied s'accompagne de la perte de fragments de cils et de cellules épidermiques sur le substrat. De plus, les contractions des valves lors de la libération finale de l'adhésif peuvent potentiellement engendrer une abrasion de l'épithélium du pied. Chez *O. edulis*, des cils emprisonnés dans les empreintes d'adhésifs ont été identifiés (Cranfield, 1975). La présence de quatre protéines présentant un rôle potentiel dans la ciliogenèse et le développement neuronal (*microtubule-associated-like 2 isoform X3*, *dynein*, *filamin A-like isoform X1 and X4*) conforte cette hypothèse. Les protéines associées au métabolisme cellulaire pourraient également résulter de la présence de cils et de cellules épithéliales au sein des empreintes d'adhésif.

Tout comme les protéines impliquées dans la machinerie cellulaire, les protéines musculaires proviennent certainement d'une contamination cellulaire du substrat lors de la libération de l'adhésif ou lors du décollement des larves.

4.2.4 Protéine non caractérisée

Une protéine non caractérisée a été détectée : *PREDICTED: uncharacterized protein LOC105327706* (Tableau 9).

Tableau 9 : Protéine non caractérisée identifiée après digestion tryptique des empreintes d'adhésif de *Crassostrea gigas*. La colonne Loc. Cell. indique la prédiction de localisation subcellulaire par le programme DeepLoc 1.0. Ext : extracellulaire.

Gène ID, Protéine ID	Nom	Loc. Cell.	Profil d'expression de gène (RPKM) par stade (E-U: Oeuf à larve, P: pédivélégère, S-J: après métamorphose, Ad: Adulte)
CGI_10007887 EKC25774	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105327706	Ext 0.30	

Respectivement 1, 2 et 3 peptides correspondant à une protéine non caractérisée ont été détectés dans les trois réplicas par l'analyse en nanoLC MS/MS avec un score MASCOT de $102,01 \pm 6,38$. Le gène CGI_10007887 codant pour une protéine non caractérisée (EKC25774 - «PREDICTED : Uncharacterized protein LOC105327706»), présente un profil d'expression particulier, avec un niveau d'expression (RPKM) maximum au stade pédivéligère. Cette protéine est composée de 298 acides aminés comprenant un peptide signal de 20 acides aminés, indiquant une potentielle exportation extracellulaire. Aucun domaine conservé n'a été détecté dans cette séquence. A la position 148, une séquence de 12 acides aminés comprend 10 glutamates qui pourraient indiquer une région intrinsèquement désordonnée. La région entre les positions 149 et 181 présente une prédiction pour un domaine en hélice, mais ce domaine ne fournit pas d'informations fonctionnelles (Burkhard *et al.*, 2001). Cependant, une séquence de 8 prolines consécutives, en position 65, pourrait être à l'origine d'une structure en hélice polyprolyne de type II (Williamson, 1994). Des structures hydrophobes sont souvent impliquées dans les interactions protéiques et l'assemblage de complexes protéiques et ont été décrites dans des protéines bioadhésives terrestres et marines (Hennebert *et al.*, 2014b). Le pI prédictif de 4,78 de cette protéine indique une densité de charge négative élevée. Cette séquence est l'une des deux de l'analyse présentant une localisation extracellulaire d'après le programme DeepLoc 1.0. Les données transcriptomiques de Zhang *et al.* (2012) ont permis d'identifier un profil d'expression génique relatif à cette séquence protéique intéressant. L'expression du transcrit est maximum au stade pédivéligère, et est détecté à partir du stade « umbo 6 » (14 jours post-fécondation) et une faible expression subsiste au stade adulte, dans les replis internes et externes du manteau. Cette observation indique un rôle potentiel de cette protéine dans l'adhésion de l'huître.

4.3 Localisation par hybridation *in situ* ARNm de la séquence non caractérisée

CGI_10007887

Parmi les 42 protéines identifiées lors de l'analyse protéomique menée après digestion tryptique des empreintes d'adhésif, une protéine non caractérisée a été identifiée (EKC25774 - « PREDICTED : Uncharacterized protein LOC105327706 »). Afin de déterminer le profil d'expression tissulaire du gène CGI_10007887 codant pour cette séquence protéique, une hybridation *in situ* ARNm a été réalisée sur des larves pédivéligères de *C. gigas* et des organismes adultes (Figure 34). D'après les résultats de cette localisation, cette protéine a été nommée *Cg_fmp* pour « *Crassostrea gigas* foot mantle protein ».

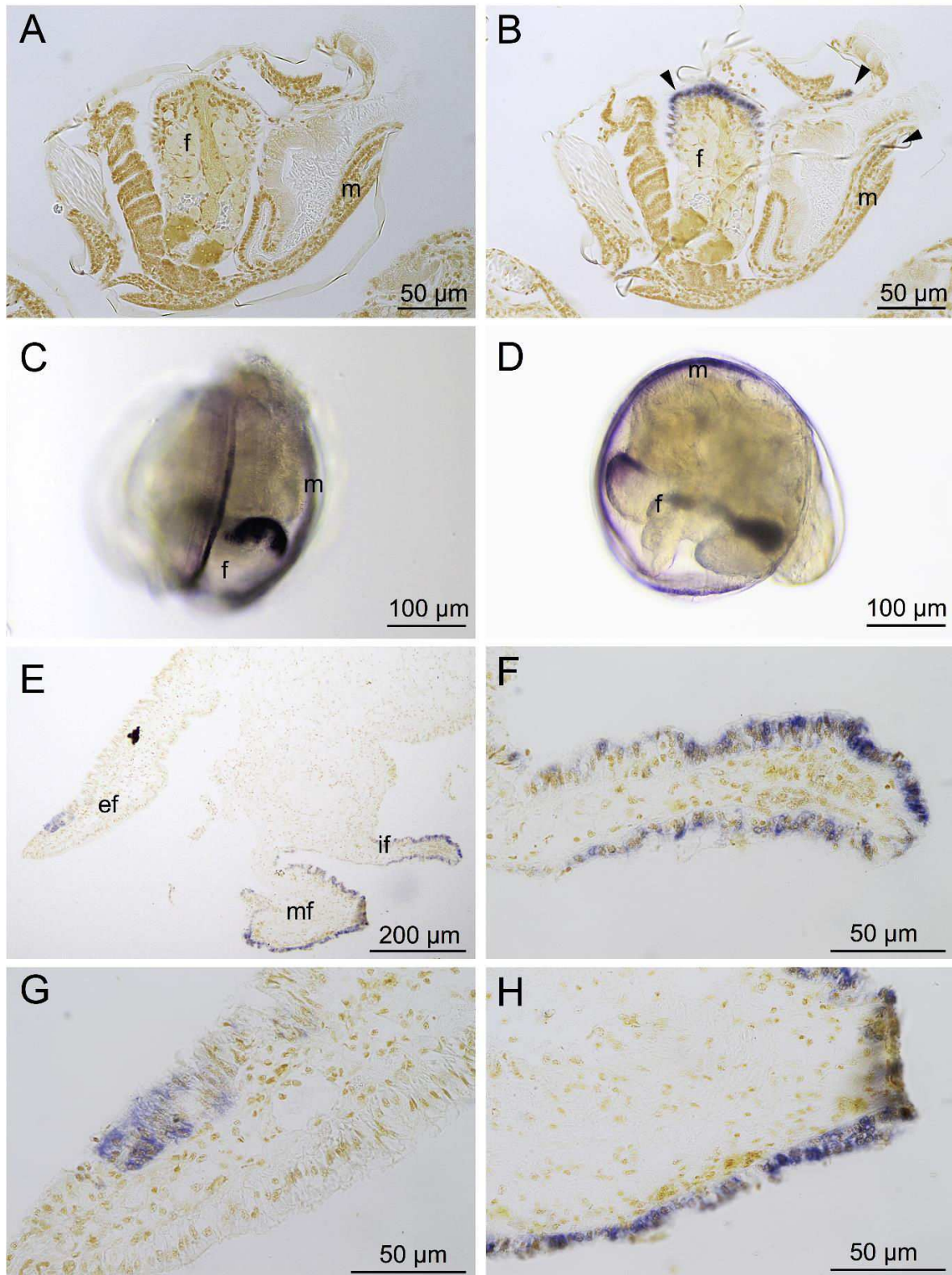


Figure 34 : Hybridation *in situ* ARNm de *Crassostrea gigas* foot mantle protein (*Cg_fmp*, CGI_10007887) chez des larves pédivéligères (A-D) et d’huître adulte (E-F) en coupes histologiques (A, B et E-H) et sur organismes entiers (C-D). A : hybridation avec la sonde sens (contrôle négatif). B-H : hybridation avec la sonde anti-sens, la coloration bleue indique la détection positive de l’ARNm de *Cg_fmp*. C : vue ventrale d’une larve pédivéligère. D : vue latérale gauche d’une larve pédivéligère. E : marge du manteau d’une huître adulte. F : repli interne de la marge du manteau. G : repli externe de la marge du manteau. H : repli médian de la marge du manteau. f : pied, m : manteau, ef : repli externe, mf : repli médian, if : repli interne (Foulon *et al.*, 2018).

Au stade pédivéligère, le transcrite de *Cg_fmp* a été localisé dans les cellules de l'épithélium de l'extrémité du pied et dans quelques cellules épithéliales de la marge du manteau (Figure 34 B-D). L'intensité du marquage à l'extrémité du pied est plus importante que dans le manteau. L'intensité du marquage présente également une décroissance au sein des tissus, depuis les cellules externes, vers les rangées de cellules sous-jacentes. Chez les huîtres adultes, l'ARNm de *Cg_fmp* a été localisé dans les 3 replis de la marge du manteau (Figure 34 E). Les cellules épithéliales cylindriques du repli interne et externe (Figure 34 F, G) et les cellules épithéliales cubiques du repli médian sont marquées (Figure 34 H).

Chez la larve pédivéligère, la localisation de l'expression du gène *Cg_fmp* dans les cellules épithéliales de l'extrémité du pied indique un rôle potentiel de cette protéine dans la phase de *crawling*. En effet, cette zone du pied n'est pas impliquée dans la sécrétion de l'adhésif final, mais présente une forte activité lors de l'exploration du substrat. Cependant, l'expression du gène *Cg_fmp* dans le manteau larvaire et adulte indiquerait une activité plus diversifiée. Bien que le rôle précis de la protéine *Cg_fmp* ne puisse être défini par l'hybridation *in situ* de l'ARNm, certaines hypothèses peuvent être formulées :

- 1) Par sa localisation à la surface du pied et du manteau, la protéine *Cg_fmp* pourrait intervenir dans la transmission de stimuli externes.
- 2) La protéine *Cg_fmp* pourrait être impliquée dans la composition ou la sécrétion de l'adhésif temporaire.

L'extrémité du pied des larves pédivéligères a probablement une fonction sensitive. La présence de structures nerveuses, parcourant le pied depuis les ganglions pédieux, jusqu'à l'extrémité du pied a été décrite chez *O. edulis*. Lors du *crawling*, l'écrasement des cils de l'extrémité du pied, observé chez les larves de *C. gigas* indique une relation intime entre cette zone et le substrat. Le *crawling* est une étape essentielle de l'adhésion chez l'huître, permettant le choix d'un site de fixation définitif pour le reste de leur vie. Le choix du site de fixation est étroitement médié par des neurotransmetteurs (Bonar *et al.*, 1990; Coon *et al.*, 1985), qui doivent être « captés » par des récepteurs localisés à la surface des cellules en contact avec le substrat. La présence de récepteurs adrénérgiques a été observée dans les organes adhésifs de la larve de balane (Gohad *et al.*, 2012). Un récepteur à octopamine a également été mis en évidence chez *C. gigas*, sur la face ventrale du pied (Ji *et al.*, 2016). La localisation de l'ARNm de *Cg_fmp* au sein de l'épithélium de l'extrémité du pied de la larve pédivéligère pourrait indiquer un rôle sensitif de la protéine. La localisation au sein de l'épithélium du manteau des larves et des adultes soutient également cette hypothèse. En effet, le manteau présente les structures cellulaires

permettant de répondre aux stimuli environnementaux (Bayne, 2017; Galtsoff, 1964; Gricourt *et al.*, 2003; Kennedy *et al.*, 1996).

Outre le potentiel rôle sensitif de cette protéine, la localisation du transcrit *Cg_fmp* peut indiquer un rôle potentiel de la protéine dans l'adhésion. Chez les mollusques calcifiés, le manteau a pour fonction principale la synthèse de la coquille. La coquille est composée d'une matrice inorganique (CaCO₃) et d'une matrice organique, le periostracum. La protéine *Cg_fmp* pourrait être un composant du periostracum, qui présente des propriétés adhésives. Cependant, les cellules marquées au stade adulte ne sont pas décrites comme sécrétrices du periostracum. D'autre part, les cellules épithéliales cylindriques du repli externe sont en contact avec la coquille, et pourraient présenter dans certaines conditions des propriétés adhésives afin de maintenir le manteau en place. Egalement, il a été relevé que les huîtres sont capables de réguler leur débit de filtration en mettant en contact les replis du manteau supérieur et inférieur (Galtsoff, 1964). Il est donc probable que certaines cellules de l'épithélium de la marge du manteau présentent des facultés d'adhésion. Enfin, bien que ceci ne fût pas observé chez la larve de *C. gigas*, il a été montré que le manteau de la larve pédivéligère d'*O. edulis* sécrétait un mélange adhésif lors de l'adhésion (Cranfield, 1974). La localisation de l'ARNm de *Cg_fmp* à l'extrémité du pied agrmente également l'hypothèse d'une fonction adhésive de cette protéine. En effet, l'adhésion de l'extrémité du pied lors de la phase de *crawling* a été observée chez la larve de *C. gigas*. Egalement, la présence de vésicules de sécrétion dans cette zone du pied, ainsi que la présence de la glande B qui débouche à l'extrémité du pied indique le rôle primordial de cette zone dans l'adhésion temporaire (Chapitre III).

L'hybridation *in situ* a donc permis de localiser les sites d'expression du gène codant pour une protéine détectée lors de l'analyse protéomique des empreintes d'adhésif de *C. gigas*. La localisation indique que cette protéine n'est probablement pas un composant de l'adhésif final, sécrété par la glande C. Cette protéine a très certainement un rôle lors de l'adhésion des larves pédivéligères lors de la phase de *crawling*.

5 Conclusion

Deux méthodes analytiques ont permis de détecter des protéines potentiellement impliquées dans l'adhésion de la larve pédivéligère de *C. gigas* :

- 1) Méthode comparative : Identification des protéines absentes chez les larves véligères et présentes chez les larves pédivéligères
- 2) Méthode directe : Identification des protéines présentes après une digestion tryptique des empreintes d'adhésif

La méthode comparative, basée sur l'extraction protéique d'organismes entiers implique la présence de protéines cellulaires, non reliées à l'adhésion de la larve pédivéligère. Cependant, cette méthode est la plus efficace, permettant de s'affranchir de l'insolubilité de l'adhésif sécrété et permettant d'obtenir suffisamment de matériel pour l'analyse protéique. Cette analyse comparative a permis d'identifier des protéines cellulaires vraisemblablement impliquées dans le développement neuronal du pied, également impliquées dans la transmission de stimuli externes déclenchant l'adhésion. Les protéines relatives au trafic cellulaire et vésiculaire probablement impliquées dans la synthèse et la sécrétion de l'adhésif ont également été identifiées. Des protéines, impliquées dans l'adhésion lors de la phase de *crawling* (mucines) et dans la structure de l'adhésif, ont été identifiées, telle qu'une séquence de collagène XII présentant des domaines de type vWF-A.

La méthode directe a également permis de mettre en évidence des protéines potentiellement impliquées dans les processus de développement du pied, mais aucune protéine impliquée dans la structure de l'adhésif permanent ne semble avoir été identifiée. L'observation en microscopie optique de la morphologie des empreintes d'adhésif après digestion tryptique ne révèle pas de changements majeurs. Ces observations supposent une résistance relative de ce bioadhésif à cette enzyme, et la difficulté de le solubiliser. Cette méthode, à priori plus spécifique, présente donc l'inconvénient de la résistance de l'adhésif de *Crassostrea gigas* après sécrétion. Cependant, l'ensemble des protéines cellulaires détectées pourrait résulter de débris cellulaires laissés sur le substrat lors de l'adhésion réversible du pied durant le *crawling*. La localisation du transcrite de la protéine non caractérisée («PREDICTED : Uncharacterized protein LOC105327706») semble d'ailleurs confirmer cette hypothèse.

Les méthodes d'analyse protéique utilisées ont donc permis d'identifier des protéines liées indirectement ou directement à l'adhésion de la larve pédivéligère de *C. gigas*. Des investigations complémentaires sont nécessaires pour valider les hypothèses formulées dans cette étude, et découvrir de nouvelles protéines d'intérêt dans la bioadhésion.

Chapitre VI

Discussion générale et perspectives

Malgré la diversité des bioadhésifs et leurs caractéristiques intéressantes (biocompatibles, biodégradables, dépourvus de métaux lourds ou de composés organiques volatiles), les adhésifs synthétiques (issus de la pétrochimie et à base de solvants) dominent aujourd'hui le marché. En théorie, le développement de bioadhésifs actifs en phase aqueuse permettrait une amélioration des solutions existantes dans des domaines variés et le développement de solutions plus respectueuses pour l'environnement. De plus, les bioadhésifs d'origine marine présentent l'avantage d'être naturellement efficaces en milieu humide, leur conférant un attrait dans le domaine biomédical. Un effort de recherche important, mené depuis une quarantaine d'année sur le byssus des moules, a ainsi permis le développement de nouveaux bioadhésifs chirurgicaux (Waite, 2017; Waite and Tanzer, 1980).

Ce travail de thèse avait pour but la caractérisation de nouveaux bioadhésifs d'origine marine à partir de l'étude de l'adhésion d'organismes marins présentant au cours de leur cycle de vie une phase pélagique (nageant dans la colonne d'eau) suivie d'une phase benthique (en étant fixé à un substrat). Le modèle d'étude retenu est la larve d'huître *C. gigas* au stade pédivéligère, présentant des avantages vis-à-vis d'autres espèces (maîtrise du cycle de vie en laboratoire, disponibilité du génome).

L'approche méthodologique a consisté à effectuer dans un premier temps une description macro- et microscopique du processus d'adhésion chez *C. gigas*, qui n'avait pas été encore décrite pour cette espèce. La description a été complétée par une étude du comportement des larves. Dans un second temps, une analyse globale de l'adhésif a été réalisée, par des approches complémentaires d'histochimie et de spectrométrie (EDX, FTIR). Les résultats obtenus par ces techniques ont permis d'envisager des analyses protéomiques de l'adhésif, complétées d'une analyse *in silico* du transcriptome de la larve pédivéligère de *C. gigas*.

Bien que nous ayons constaté l'absence de données disponibles dans la littérature concernant l'adhésion larvaire chez *C. gigas*, quelques études s'intéressant à l'adhésion des larves pédivéligères d'autres espèces de bivalves telles *M. edulis*, *O. edulis*, *P. maximus* et *C. virginica* (Cranfield, 1973a; Elston, 1980; Gruffydd *et al.*, 1975; Lane and Nott, 1975) ont été publiées. Ces travaux décrivent la morphologie de la larve pédivéligère et permettent une première caractérisation biochimique de l'adhésif, par observations en microscopie et marquages histochimiques, mais sans approche relevant de la biologie moléculaire. En effet, ces études menées avant 1980 ont été réalisées avant le développement de la génomique et de la biologie moléculaire. La qualité et le niveau de détail de ces recherches ont tout de même permis d'aborder le modèle *C. gigas* en bénéficiant de connaissances de base.

Cependant, malgré l'appartenance de *C. gigas* à la même classe d'organisme que les espèces précédemment citées (*Bivalvia*), il était important d'aborder cette étude sans « *a priori* » afin de ne

pas tirer de conclusions hâtives quant à la structure et la composition de l'adhésif sécrété par la larve pédivéligère de *C. gigas*. D'autre part, les outils disponibles aujourd'hui permettent une analyse plus approfondie de l'adhésif de *C. gigas*, par comparaison aux études menées précédemment. Ils autorisent également une approche plus conceptuelle même si seule une partie des hypothèses formulées a pu être démontrée par les résultats obtenus grâce aux outils modernes de la protéomique et de la biologie moléculaire. Un effort de synthèse a été fait pour chacune des étapes clés par la réalisation de schémas réunissant les hypothèses formulées et validées par les différentes approches.

Cette thèse a mobilisé des connaissances pluridisciplinaires et de niveau technologique très variés : zootechnie (production de cohortes larvaires homogènes en stade de développement), préparations et observations en microscopie (histologie, MET et MEB), biologie moléculaire (ISH), captures par microdissection laser, techniques de spectroscopie (FTIR, EDX), analyse *in silico* par outils bio-informatiques, analyse protéomique par spectrométrie de masse. La manipulation de matériel biologique vivant, sensible et de taille micrométrique, a également nécessité l'adaptation de certaines méthodes d'analyse, notamment face à la quantité très réduite de bioadhésif disponible. C'est par l'utilisation et la complémentarité de l'ensemble de ces méthodes que deux aspects majeurs du phénomène d'adhésion chez *C. gigas* ont pu être étudiés :

- 1) La morphologie de la larve pédivéligère de *C. gigas* et de l'adhésif sécrété à ce stade a été étudiée, permettant de mettre en évidence des homologues chez les mollusques bivalves.
- 2) La composition moléculaire de l'adhésif de *C. gigas* a été investiguée, permettant de proposer un modèle d'interactions moléculaires.

1 Homologies morphologiques du pied chez les mollusques bivalves précédemment étudiés et *C. gigas*.

Le chapitre III a permis de présenter la morphologie de la larve pédivéligère de *C. gigas*. Des comparaisons ont pu être effectuées avec les descriptions disponibles chez *O. edulis*, *C. virginica*, *M. edulis* et *P. maximus* (Cranfield, 1973a; Elston, 1980; Gruffydd *et al.*, 1975; Lane and Nott, 1975). Ceci a permis de mettre en évidence des homologues morphologiques importantes entre le pied de la larve pédivéligère de *C. gigas* et le pied des larves pédivéligères des 4 espèces précédemment citées, plus particulièrement avec *O. edulis*. Des différences ont également été identifiées, certaines glandes ainsi que des canaux annexes du canal byssal, présents chez *O. edulis* n'ont pas été observés avec le même niveau de détail chez *C. gigas*. Ceci résulte d'un effort d'observation plus élevé chez *O. edulis*, notamment par la description complète du pied effectuée en microscopie électronique en transmission menée par Cranfield H.J. (1973a). La glande C, qui permet la sécrétion de l'adhésif

permanent de la larve pédivéligère est également décrite chez les autres espèces étudiées. Cependant, ces études n'ont pas été réalisées avec les mêmes méthodes et avec le même effort d'observation. Afin d'identifier les différences et homologues spécifiques chez les larves pédivéligères de mollusques bivalves, il serait nécessaire d'effectuer une observation détaillée chez les différentes espèces, avec un protocole identique et un même observateur, afin de s'affranchir des biais d'observation et d'identification pouvant être liés aux descriptions microscopiques. De plus, les méthodes nouvelles de microscopie électronique 3D pourraient permettre de décrire les glandes adhésives avec une précision encore jamais acquise (*3D Field Emission Microscopy*).

Des homologues entre le pied de la larve pédivéligère de *C. gigas* et le pied hautement spécialisé des moules adultes peuvent également être soulignées (Andrade *et al.*, 2015; Waite, 2017). Les cils, le canal byssal et le sillon byssal sont des structures retrouvées chez ces organismes. Cependant, l'agencement des glandes au sein du pied de la moule adulte *M. edulis* (Priemel *et al.*, 2017) est très différent de celui décrit chez les larves pédivéligères chez la même espèce (Lane and Nott, 1975). Ces différences apparaissent également avec le pied de la larve pédivéligère de *C. gigas*. Ceci indique que les similitudes observées dans le pied des larves pédivéligères des mollusques bivalves s'effacent lors de la métamorphose.

Des similitudes sont également observées entre les larves pédivéligères et les moules adultes, par la production de filaments de byssus par le pied (Chapitre III). Cependant, la structure des filaments produits lors de la phase de *crawling* par les larves pédivéligères semble différente des byssus spécialisés produits par certains mollusques bivalves adultes. En effet, la présence de plaque byssale n'a pas été observée chez les larves pédivéligères, indiquant une structure et une composition probablement différente.

Les cils présents autour du pied jouent un rôle essentiel chez les moules adultes (Andrade *et al.*, 2015). Ils permettent par leur structure l'établissement de multiples liaisons de faible énergie (van der Waals), permettant au pied d'adhérer sur le substrat (Andrade *et al.*, 2015). Ce mécanisme s'apparente à l'adhésion mécanique décrite chez le gecko (Autumn *et al.*, 2006). Les interactions de faible énergie sont possibles chez ces organismes par la présence de structures biologiques très fines, favorisant un contact intime avec le substrat. Chez le gecko, l'extrémité des seta se ramifie pour former des structures d'une centaine de nanomètres de diamètre. Les cils présents à la surface du pied de la moule se rétrécissent à leur extrémité pour atteindre un diamètre également voisin de la centaine de nanomètres (Andrade *et al.*, 2015). Le rétrécissement de la partie distale des cils chez la larve de *C. gigas* a également été observé, atteignant une taille d'une centaine de nanomètres. Il y a donc quelques homologues dans l'adhésion des mollusques bivalves entre les espèces au stade pédivéligère,

et entre les stades larvaire et adulte. **Il est donc très probable que les cils du pied permettent une adhésion mécanique lors de la phase de *crawling* de *C. gigas*. Une étude plus détaillée de ce phénomène d'adhésion mécanique réversible en milieu aqueux chez les mollusques pourrait permettre le développement de nouveaux adhésifs réversibles en milieu humide. Actuellement, les développements biomimétiques basés sur l'adhésion de substrats micro-structurés se sont principalement inspirés de la stratégie du gecko, et présentent actuellement un manque d'efficacité en milieu humide (Stark *et al.*, 2015).**

Dans le domaine biomédical, l'emploi de ce type de substrat pourrait pourtant permettre le développement de nouvelles solutions de collage des pansements, ou des micro-appareillages électroniques (électrodes, capteurs).

2 Natures des différents adhésifs sécrétés par la larve pédivéligère de *C. gigas*

Deux types d'adhésif sont sécrétés par la larve pédivéligère de *C. gigas*. Dans un premier temps, des sécrétions adhésives réversibles sont produites lors de la phase de *crawling*. Ensuite, un adhésif permanent est sécrété, permettant l'adhésion définitive de la larve avant métamorphose. Cette stratégie est également observée chez la larve cypris de balane (Gohad *et al.*, 2012; Yap *et al.*, 2017). Notre étude visait principalement à décrire l'adhésif permanent de *C. gigas*, qui est produit en quantité plus importante que l'adhésif réversible.

2.1 Adhésif réversible lors du *crawling*

Au-delà de la morphologie du pied, des similitudes ont également été observées dans la composition des glandes adhésives entre *C. gigas* et les différentes espèces étudiées. Ainsi, les glandes situées sur la face ventrale du pied des larves pédivéligères interviennent lors de la phase de *crawling*. Elles permettent l'adhésion réversible du pied, par sécrétion d'un adhésif d'abord de nature polysaccharidique (glandes A), puis de nature glycoprotéique (glandes B), autorisant probablement des liaisons au substrat. L'étude détaillée de ces sécrétions adhésives réversibles permettrait probablement d'identifier de nouvelles molécules adhésives. Cependant, la très faible quantité de composés produits rend difficile ce type d'étude. Il serait possible d'envisager des marquages par lectines des substrats après avoir enregistré le parcours des larves lors de la phase de *crawling*. Ainsi, il serait peut-être possible d'identifier des groupements polysaccharidiques sécrétés au cours de l'exploration du substrat (Hennebert *et al.*, 2011).

Dans les mécanismes d'adhésion réversible, plusieurs modèles de dé-adhésion ont été proposés par Lengerer and Ladurner (2018) : i) modèle compétitif, ii) modèle enzymatique, iii) modèle mécanique. Chez *C. gigas*, lors de la phase de crawling, l'adhésion réversible a été principalement observée à l'extrémité du pied. Nos observations indiquent que *C. gigas* utilise probablement un modèle mécanique pour rompre l'adhésion lors du crawling, par contraction musculaire du pied. Cette stratégie implique probablement la perte de débris cellulaires sur le substrat, comme indiquée par la présence de protéines cellulaires détectées lors de l'analyse directe des empreintes d'adhésif.

2.2 Adhésif permanent lors de l'adhésion

La glande C permet la biosynthèse de l'adhésif permanent sous forme de granules protéiques et sa libération, provoquant l'adhésion définitive de la larve pédivéligère avant métamorphose. Cette glande présente une morphologie et un contenu semblable chez *C. gigas*, *M. edulis*, *P. maximus* et *O. edulis*. Dans le chapitre III, l'analyse FTIR des empreintes d'adhésif de *C. gigas* a mis en évidence la présence majoritaire de protéines. La déconvolution de ces pics permettrait d'identifier avec plus de précision les groupements chimiques, ainsi que des conformations protéiques telles que des hélices, des replis, des feuillettes, des zones désordonnées, présentes dans la structure des protéines de l'adhésif (Barlow and Wahl, 2012). Il serait également intéressant de compléter cette analyse par d'autres méthodes spectroscopiques telles que le RAMAN ou par des mesures de dichroïsme circulaire. En effet, ces méthodes complémentaires ont déjà permis d'identifier des groupements chimiques et des conformations moléculaires intervenant dans les bioadhésifs d'autres organismes (Barlow *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2007; Hwang and Waite, 2012; Suci and Geesey, 2001).

Une analyse spectroscopique *in vivo* pourrait également être réalisée chez les larves de *C. gigas* afin de définir les changements moléculaires intervenant au cours de la sécrétion et de la réticulation de l'adhésif. Cette analyse effectuée chez la larve pédivéligère de moule *Perna canaliculus* a permis de mettre en évidence la présence de glycoprotéines et de groupements sulfatés dans l'adhésif permanent (Petroni *et al.*, 2008). Cet adhésif serait ensuite complété par un adhésif riche en CaCO_3 , comme évoqué chez *C. virginica* par Tibabuzo Perdomo *et al.* (2018). Mais la présence de la coquille proche de l'adhésif lors de la sécrétion peut rendre difficile l'interprétation des spectres obtenus, puisque les pics attribués au CaCO_3 peuvent provenir de celle-ci.

La présence probable de polysaccharides sulfatés dans les empreintes d'adhésif de *C. gigas* a été identifiée par FTIR. Ce résultat concorde avec les observations menées chez *O. edulis* indiquant la présence de polysaccharides sulfatés liés aux granules protéiques dans la glande C, et dans l'adhésif sécrété (Cranfield, 1973c, 1975). L'identification des polysaccharides impliqués dans l'adhésion pourrait permettre une meilleure compréhension du phénomène d'adhésion chez *C. gigas*.

Cependant, nos tentatives d'identification des polysaccharides présents au sein de l'adhésif de *C. gigas* par GC-MS n'ont pas permis d'identifier de polysaccharides faute de matériel biologique suffisant (données non présentées). La part de polysaccharides dans l'adhésif est probablement très faible, comparée à la part protéique, expliquant l'absence d'identification. Des marquages histochimiques par lectines pourraient permettre d'identifier les groupements polysaccharidiques présents dans l'adhésif, comme réalisés chez l'étoile de mer *Asterias rubens* (Hennebert *et al.*, 2011). Cependant, la forte auto-fluorescence des empreintes d'adhésif rend cette identification difficile.

La part protéique de l'adhésif permanent de *C. gigas* est prédominante, ceci a permis d'envisager l'identification des séquences protéiques afin de comprendre certains des mécanismes moléculaires permettant l'adhésion.

3 Identification de gènes et de protéines intervenant probablement dans l'adhésion de la larve pédivéligère de *C. gigas*

3.1 Adhésion réversible et détection du substrat lors de la phase de *crawling*

L'analyse protéique menée sur les empreintes d'adhésif a permis d'identifier majoritairement des protéines cellulaires impliquées dans la phase de *crawling*. Parmi ces protéines, une protéine non caractérisée, nommée *Cg_fmp*, a été détectée. **La localisation cellulaire de l'expression du gène codant pour la protéine *Cg_fmp* indique une implication lors de la phase de *crawling*, avec deux rôles potentiels identifiés : i) un rôle sensitif, ii) un rôle adhésif.**

La transmission de signaux extracellulaires provoquant l'adhésion est essentielle chez les larves pédivéligères. L'ensemble des protéines identifiées dans l'étude comparative, impliquées dans le développement neuronal et dans la transmission de signaux confirme cette observation. Lors de l'adhésion, les larves pédivéligères d'huître montrent un comportement grégaire. Ainsi, il est fréquent d'observer une accumulation des larves fixées dans une même zone. Ce comportement est présent chez de nombreux organismes marins (Burke, 1986; Dreanno *et al.*, 2006b), et a été décrit chez *C. gigas* (Coon *et al.*, 1985). Ce comportement est lié à la réception de signaux chimiques externes induisant l'adhésion. Les études menées sur ce phénomène chez l'huître, ont permis de déterminer que l'adhésion est médiée par un mécanisme faisant intervenir la voie dopaminergique. L'initiation de la métamorphose est ensuite médiée par la voie adrénérgique (Bonar *et al.*, 1990; Coon *et al.*, 1985). Chez *C. virginica*, une glycoprotéine induisant l'adhésion des larves pédivéligères a été identifiée dans la coquille des organismes adultes (Vasquez *et al.*, 2013). Les mécanismes d'action des molécules déclenchant l'adhésion chez les larves de mollusques marins sont encore mal connus (Young *et al.*,

2015). La présence de certaines espèces d'algues est un facteur susceptible d'induire l'adhésion chez certains organismes marins (Casoli *et al.*, 2016; jing Ding *et al.*, 2017; Spotorno-Oliveira *et al.*, 2015; Steller and Cáceres-Martínez, 2009). Certaines molécules libérées par des biofilms bactériens (ions, acides aminés, peptides, neurotransmetteurs, dérivés de la choline, inhibiteurs d'enzymes) peuvent également agir comme signaux d'adhésion chez les larves de bivalves (Alfaro *et al.*, 2011), ainsi que chez les larves d'autres organismes marins (Hadfield, 2011).

Afin de comprendre les signaux induisant ce comportement, et d'identifier précisément les molécules mises en jeu, il serait intéressant d'étudier cet aspect de l'adhésion, qui présente de plus, un intérêt aquacole permettant potentiellement d'imaginer de nouvelles solutions pour un recrutement plus efficace des larves d'huître destinées à l'ostréiculture.

3.2 Adhésion permanente, fibres adhésives

3.2.1 Méthodes d'analyse complémentaires

La disponibilité du transcriptome au cours du développement larvaire avec la publication du génome chez *Crassostrea gigas* par Zhang *et al.* (2012) a permis d'aborder l'adhésion larvaire chez l'huître sous un angle nouveau. Une recherche de gènes spécifiquement exprimés au stade pédivéligère a été réalisée (chapitre IV) afin d'identifier des séquences potentiellement impliquées dans l'adhésion de la larve de *C. gigas*. Cette étude a été complétée par des analyses protéomiques (chapitre V), menées sur des larves entières et sur l'adhésif sécrété, dans le but d'identifier des protéines probablement impliquées dans l'adhésion. L'ensemble des séquences sélectionnées pour leur spécificité d'expression au stade pédivéligère (chapitre IV) n'ont pas été identifiées lors des analyses protéomiques (chapitre V). Et inversement, l'ensemble des protéines identifiées lors des analyses protéomiques n'avaient pas été sélectionnées pour leur spécificité d'expression au stade pédivéligère. Ces deux approches sont complémentaires. Les séquences communes aux deux méthodes ont été identifiées lors de l'analyse protéomique comparative, réalisée sur des larves entières. Les données transcriptomiques analysées ont également été obtenues à partir d'organismes entiers. Cette méthode présente donc l'inconvénient d'être peu « tissu spécifique », mais les tentatives d'analyse protéomique plus spécifique (menées sur la glande C) n'ont pas permis d'obtenir de résultats faute de quantité d'échantillon suffisante. Afin de compléter nos observations, une analyse plus fine du transcriptome pourrait être réalisée, après prélèvement par microdissection laser de la glande C et séquençage des ARN. En effet, l'étude des acides nucléiques peut être réalisée sur de faibles quantités d'échantillons biologiques puisqu'il est possible par transcription *in vitro* de les amplifier, ce qui n'est pas le cas pour l'analyse des protéines.

Cependant, les connaissances acquises grâce à l'observation du comportement des larves et aux descriptions morphologiques en histologie et en MEB ont permis de définir que le processus de biosynthèse de l'adhésif est relativement court dans le temps. Ceci a permis de sélectionner une fenêtre temporelle d'analyse et une taille de larve (par tamisage) coïncidant avec l'apparition de la glande C de *C. gigas*, qui a permis *in fine* une analyse robuste de nos résultats.

3.2.2 Implication probable de protéines de type perlucine dans l'adhésion

Ainsi, des gènes codant pour des protéines de type « perlucine » ont été identifiés comme spécifiques du stade pédivéligère et les protéines correspondantes ont été identifiées lors de l'analyse protéique comparative. Ces protéines présentent la particularité de contenir un domaine lectine de type C, permettant vraisemblablement la fixation à un sucre. Ce domaine peut être en lien avec la présence probable de polysaccharides sulfatés dans l'adhésif de *C. gigas*. Les domaines lectine de type C ont été identifiés dans des protéines d'adhésif réversible chez les échinodermes (Hennebert *et al.*, 2014b, 2015; Peng *et al.*, 2014), d'adhésif de défense de limaces terrestres (Smith *et al.*, 2017), d'adhésifs permanents chez les balanes (De Gregorio *et al.*, 2015), et dans le byssus des bivalves du genre *Atrina* (Yoo *et al.*, 2016a). Plusieurs niveaux d'interactions moléculaires peuvent être identifiés dans ces différentes études. Chez les échinodermes (étoile de mer, holothurie), le domaine lectine de type C participerait à la liaison entre la partie protéique et la partie polysaccharidique de l'adhésif, permettant le maintien de la structure adhésive (Flammang *et al.*, 2016; Hennebert *et al.*, 2014b, 2015; Peng *et al.*, 2014). Chez *Atrina pectinata*, la protéine contenant un domaine lectine de type C est présente dans la partie distale du byssus, permettant la liaison entre celui-ci et les tissus du pied, permettant une élasticité de l'ancrage du byssus (Yoo *et al.*, 2016a). Enfin, chez la balane *Amphibalanus amphitrite*, les protéines contenant des domaines lectine de type C sont probablement liées à la calcification de la base, et interviendraient donc probablement dans l'interface entre le ciment et la plaque calcifiée (De Gregorio *et al.*, 2015). L'adhésif de *C. gigas*, tout comme pour les balanes, permet la jonction entre le substrat et la coquille composée de carbonate de calcium.

Les perlucines sont classiquement décrites comme impliquées dans la calcification, il est donc probable que ces protéines soient présentes dès le stade pédivéligère afin d'initier rapidement la calcification accompagnant la métamorphose. Mais il est aussi possible de proposer un rôle dans la jonction entre l'adhésif et la coquille, par la liaison à des polysaccharides du periostracum via le domaine lectine de type C.

D'autre part, l'étude récente de Tibabuzo Perdomo *et al.* (2018) a mis en évidence la présence d'un adhésif très fin, de composition organique, entre la couche prismatique de carbonate de calcium de la coquille et le substrat, apparaissant après la métamorphose. Il est possible que cet adhésif soit

composé de protéines de type perlucine, présentant à la fois la capacité d'adhérer au substrat, et permettant la nucléation des cristaux de carbonate de calcium. Ces protéines pourraient donc être synthétisées au stade pédivéligère en prévision de cette adhésion après métamorphose. Le rôle exact de ces protéines contenant un domaine lectine de type C reste donc à élucider. La localisation de ces protéines permettrait de fournir de plus amples indications quant à leur rôle dans l'adhésion et/ou la calcification des stades précoces de *C. gigas*. Une analyse protéomique de l'adhésif sécrété après la métamorphose, lors de la croissance de la coquille pourrait également permettre de savoir si ces protéines sont présentes à ce stade. Cependant, il est probable que cette matrice protéique soit comme l'adhésif sécrété au stade pédivéligère, et soit très résistante aux extractions protéiques.

Le collagène est une protéine majoritaire (90%) et centrale du filament de byssus chez les moules adultes, participant à la structure et aux propriétés physiques de ce bioadhésif (Waite, 2017). Plusieurs types de collagène sont présents dans le byssus de moule, nommés preCols (PreCol P, PreCol D, preCol NG) et PTMP ou TMP (Waite, 2017). Les collagènes sont localisés dans la partie du filament et absents de la plaque byssale, permettant la transition entre la rigidité de la plaque byssale et l'élasticité du filament, ils permettent *in fine* la robustesse du byssus. **La structure fibreuse de l'adhésif de la larve de *C. gigas* provient probablement d'une composition riche en collagène. En effet, des gènes codant pour des collagènes ont été identifiés comme spécifiquement exprimés au stade pédivéligère et un collagène a été identifié chez les larves pédivéligères lors de l'analyse protéique comparative.**

3.2.3 Le collagène, protéine structurale de l'adhésif ?

Chez *C. gigas*, les 2 séquences de collagène, identifiées comme potentiellement impliquées dans l'adhésion comporte des homologies structurales avec la protéine PTMP-1 présente dans la partie distale du byssus de *M. galloprovincialis* et *P. fucata* (Liu *et al.*, 2015; Suhre and Scheibel, 2014; Suhre *et al.*, 2014) (collagène VI et XII). Cette similarité provient de la présence de domaines vWF-A et avec des sites MIDAS. Une étude s'est intéressée au rôle du collagène et des protéines contenant des domaines vWF et des sites MIDAS dans le byssus de moule, mettant en évidence plusieurs fonctions (Yoo *et al.*, 2016b). Nous avons vu que le pI de la séquence de collagène identifiée lors de l'analyse protéique comparative (collagène XII) est très proche du pI de la PTMP-1. Chez la moule, le faible pI de cette protéine génère une forte inversion de charge lors de sa libération dans l'eau de mer depuis la glande acide chez la moule. Cette inversion de charge (de positif à négatif) permet le renforcement des liaisons entre la protéine proximale et la séquence de collagène (preCol-P) qui est chargé positivement dans l'eau de mer (Yoo *et al.*, 2016b). **Chez *C. gigas*, il est possible que les séquences de collagène comportant des domaines vWF-A, puissent se lier aux séquences de collagènes identifiées comme spécifiquement exprimées au stade pédivéligère. De plus, les domaines MIDAS, présent avec les domaines vWF-A permettent la liaison de cations divalents qui agissent ainsi comme cofacteurs**

de l'adhésion (Yoo *et al.*, 2016b). Afin d'identifier précisément le rôle de ces séquences de collagène chez *C. gigas*, une localisation de ces protéines au sein de l'adhésif serait nécessaire.

Enfin, parmi les gènes spécifiquement exprimés au stade pédivéligère, dont les protéines ont été identifiées dans l'analyse protéomique comparative, d'autres séquences sont potentiellement impliquées dans la structure de l'adhésif. Cependant ces protéines ne présentent pas d'homologues formellement identifiés dans d'autres organismes marins. Certaines de ces séquences ne sont pas caractérisées et présentent une prédiction de localisation extracellulaire. Nous avons vu lors de l'analyse protéique portant sur les empreintes d'adhésif, que la protéine non caractérisée présentait par sa localisation cellulaire une implication probable dans la phase de *crawling* et donc dans le processus d'adhésion. Ainsi, il serait nécessaire de localiser l'ensemble des transcrits des séquences non caractérisées dans les différentes analyses afin de déterminer leur rôle potentiel dans l'adhésion. **Enfin, la localisation des protéines d'intérêt (perlucines, collagènes) par la création d'anticorps spécifiques serait nécessaire afin de valider leur implication dans l'adhésif et d'identifier éventuellement certaines interactions par leur localisation.**

4 Groupements chimiques intervenant dans l'adhésion permanente de *C. gigas*

4.1 La DOPA est-elle présente dans l'adhésion de *C. gigas* au stade pédivéligère ?

Parmi les molécules d'adhésion les plus étudiées chez les organismes marins, plus particulièrement chez les moules adultes, figure la **DOPA** (L-3,4-dihydroxyphénylalanine). La DOPA est synthétisée à partir d'une tyrosine, hydroxylée par une phénoloxydase (tyrosinase). La présence de protéines riches en tyrosine, modifiées en DOPA est l'une des caractéristiques du byssus de moule (Waite, 2017; Waite and Tanzer, 1980). Les études anciennes menées chez les larves pédivéligères supposent la présence de phénoloxydase dans la glande principale du pied, impliquant une probable présence de DOPA dans l'adhésif sécrété à ce stade (Cranfield, 1973a; Gruffydd *et al.*, 1975; Lane and Nott, 1975).

Chez *C. gigas*, lors de l'analyse des gènes spécifiquement exprimés au stade pédivéligère, des séquences impliquées dans les mécanismes d'oxydoréduction telles que des tyrosinases et des peroxydases ont été identifiées. La présence de ces enzymes spécifiques du stade pédivéligère pourrait indiquer la présence de DOPA dans l'adhésif de *C. gigas*. Cependant, ces enzymes n'ont pas été détectées lors des analyses protéomiques chez la larve pédivéligère de *C. gigas*. Il est probable que ces protéines ne soient pas présentes en quantité suffisante pour être détectées par nos protocoles d'analyse. Le seuil de détection du spectromètre de masse utilisé est d'environ 1 femtomole de

protéine. Cependant l'intervention de la DOPA dans l'adhésif de *C. gigas*, basée sur l'homologie observée entre les larves pédivéligères et les moules adultes, demeure incertaine. De plus, aucune séquence protéique riche en tyrosine n'a été identifiée comme impliquée dans l'adhésion chez les larves pédivéligères de *C. gigas*. Hormis la présence de granules de phénoloxydase, observée par marquage histochimique en microscopie électronique en transmission, chez la larve pédivéligère de *O. edulis* et de *M. edulis*, aucune étude ne confirme formellement la présence de DOPA dans l'adhésion des larves pédivéligères de mollusque bivalve. De plus, la présence de ces phénoloxydases dans la glande principale du pied d'*O. edulis* et de *M. edulis*, n'a pas été retrouvée dans l'adhésif après sécrétion. Chez *C. gigas*, les tentatives pour identifier des groupements catéchols dans les glandes et l'adhésif se sont révélées vaines. Cependant, un marquage au nitro-bleu de tétrazolium (Paz *et al.*, 1991) des empreintes d'adhésif de *C. gigas* a révélé la présence d'une forte activité oxydo-réductrice de l'adhésif après sécrétion. **Ceci indique donc que des groupements oxydo-réducteurs interviennent dans l'adhésion de la larve pédivéligère de *C. gigas*, mais que si la DOPA est présente au sein de l'adhésif, elle l'est sous une forme non détectable par la méthode de Arnow (1937). Cette coloration est efficace uniquement si des groupements OH sont disponibles.**

D'autre part, les bioadhésifs riches en DOPA présentent une structure mousseuse plutôt que fibreuse. Cette structure s'observe dans la plaque byssale du byssus chez les moules (Filippidi *et al.*, 2015; Waite *et al.*, 2005) et dans l'adhésif sécrété par les polychètes tubicoles du genre *Phragmatopoma* et *Sabellaria* (Becker *et al.*, 2012; Stewart *et al.*, 2004). Cette structure résulte des mécanismes de coacervation de l'adhésif avant sa sécrétion. Les protéines composant l'adhésif sont réparties sous formes de gouttelettes en 2 phases par des forces électrostatiques (Stewart *et al.*, 2017; Waite, 2017). Lors de la libération de l'adhésif, cette conformation provoque la formation d'un adhésif mousseux lors de la réticulation.

La structure fibreuse de l'adhésif de la larve pédivéligère de *C. gigas*, ainsi que l'ensemble des observations discutées précédemment semblent indiquer l'absence de DOPA dans l'adhésif de *C. gigas* au stade pédivéligère. Cette conclusion n'est pas catégorique, et des investigations complémentaires seraient nécessaires pour statuer sur ce point.

4.2 Interactions moléculaires probables dans l'adhésif de *C. gigas*

Si la DOPA n'est pas présente dans l'adhésif de *C. gigas*, d'autres groupements chimiques interviennent plus probablement dans l'adhésion au stade larvaire. Du **soufre** a été identifié dans les empreintes d'adhésif de *C. gigas* ainsi que **des protéines présentant des régions riches en cystéine** lors de l'analyse protéomique.

Il est probable que les ponts disulfures jouent un rôle important dans l'adhésion de *C. gigas*. Chez les balanes, dont l'adhésif n'est pas composé de DOPA, la présence de protéines riches en cystéine permet l'établissement de ponts disulfures au sein de l'adhésif (Kamino, 2001; Naldrett and Kaplan, 1997). Les ponts disulfures peuvent être intra-moléculaires, ils participeraient au maintien de la conformation structurale de la protéine dans un environnement extracellulaire. Ils peuvent aussi être inter-moléculaires, dans ce cas, ils seraient impliqués dans la formation de liaisons entre différentes protéines de l'adhésif (Kamino, 2001). Des enzymes impliquées dans la modification des ponts disulfures (disulfides isoméras) ont été identifiées chez *C. gigas* lors de l'analyse des empreintes d'adhésif. Chez les polychètes *Phragmatopoma californica*, la présence de cystéine dans les protéines adhésives permet également la formation de liaisons covalentes, le groupement thiol et la DOPA formant des liaisons intermoléculaires (5-S-cysteinyldopa) responsables de la solidification rapide de l'adhésif (Zhao *et al.*, 2005). Ce type de liaison a également été identifié dans la plaque byssale chez les moules (Waite, 2017; Zhao and Waite, 2005, 2006).

D'autre part, il est probable que des **protéines phosphorylées** interviennent dans l'adhésion de la larve pédivéligère de *C. gigas*. L'analyse FTIR des empreintes d'adhésif de *C. gigas* a révélé une présence probable de phospho-sérines dans l'adhésif. De plus, les enzymes de type peptidyl prolyl cis trans isomérase identifiées dans les analyses protéiques chez *C. gigas* pourraient intervenir dans la conformation structurale des protéines phosphorylées (Fischer, 1994). Dans les protéines adhésives identifiées chez les organismes marins, l'O-phosphorylation des sérines a été décrite dans certaines protéines adhésives de *Phragmatopoma californica* et dans certaines protéines du byssus de moule (Flammang *et al.*, 2009). Il est également possible que certaines protéines adhésives de l'oursin *Paracentrotus lividus* puissent être phosphorylées, comme le montre l'identification d'enzymes impliquées dans cette modification post-traductionnelle dans le protéome des podia (Lebesgue *et al.*, 2016). Les phosphosérines permettent une interaction ionique avec des cations divalents tels que la Ca^{2+} ou le Mg^{2+} . Chez les moules et les polychètes, les protéines adhésives sont stockées dans la glandes à un pH acide (Stewart *et al.*, 2017; Waite, 2017; Zhao *et al.*, 2005). Lors de la libération de l'adhésif, suite à la hausse du pH résultant du contact avec l'eau de mer, les liaisons entre les phosphates et les cations divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}) passent d'interactions électrostatiques à des liaisons ioniques, de plus forte énergie, permettant une solidification rapide de l'adhésif. Ainsi, la solubilité des groupements phosphosérine complexés aux cations divalents diminue avec une hausse de pH, entraînant une agrégation. Ce processus pourrait expliquer la solidification rapide de l'adhésif lors de sa libération chez la larve pédivéligère de *C. gigas*. La phosphorylation des protéines adhésives peut être une adaptation à l'adhésion sur des substrats carbonatés (Waite and Qin, 2001; Wiegemann, 2005). Des protéines phosphorylées ont également été identifiées dans l'adhésif des balanes. Localisées à

l'interface de l'adhésif et de la plaque, ces protéines présentent également un rôle probable dans la calcification (Dickinson *et al.*, 2016; Fears *et al.*, 2018). La présence de protéines phosphorylées au sein de l'adhésif de *C. gigas* serait compatible avec l'affinité des larves pédivéligères d'huître avec les substrats carbonatés lors de l'adhésion. De plus, l'interface entre l'adhésif et la coquille de la larve présente une liaison très forte puisque lors du décollement intentionnel des larves, aucune rupture de cette interface n'est observée, au profit d'une rupture de la coquille ou bien de la partie centrale des fibres adhésives.

De nombreuses **protéines contenant des sites de liaison au calcium** ont été identifiées lors de la recherche de gènes impliqués dans l'adhésion et des analyses protéiques menées chez *C. gigas* (*calmodulin*, *protocadherin FAT 4*, *EF-hand protein*, *EGF domain*). Ces protéines peuvent être impliquées dans de nombreux processus cellulaires. Cependant, la présence de calcium au sein de l'adhésif de *C. gigas* détectée par l'analyse EDX et la présence de ces protéines chez les larves pédivéligères pourraient indiquer un rôle dans l'adhésion, par induction d'interactions ioniques permettant la cohésion de l'adhésif. Cependant ce point demeure hautement hypothétique, du fait de l'intervention probable de ces protéines dans des processus cellulaires indirectement liés à l'adhésion.

Enfin, nous avons précédemment mis en avant le rôle des domaines protéiques de type **von Willebrand Factor** dans la structure de l'adhésif de la larve pédivéligère de *C. gigas*. Ces domaines protéiques présentent des propriétés de liaison avec d'autres protéines telles que les collagènes qui sont dépendantes de la présence de cations divalents par la présence de sites MIDAS (Smith *et al.*, 2017; Whittaker and Hynes, 2002; Yoo *et al.*, 2016b).

Il semble donc très probable que les interactions ioniques aient une place prépondérante dans la structure et l'efficacité de l'adhésif de la larve pédivéligère de *C. gigas*.

4.3 Relations entre la structure physique de l'adhésif de *C. gigas* et sa composition moléculaire

4.3.1 Répartition de l'adhésif lors de la sécrétion

Comme l'ont montré les observations en microscopie optique et les images capturées en MEB, l'adhésif sécrété par une décharge rapide de la glande C, au niveau de la face ventrale de la larve, se répartit immédiatement sous la coquille de la larve, formant un joint parfait entre le substrat et la coquille et ceci tout autour de la larve. Cependant, les mécanismes de répartition de l'adhésif sous la valve gauche de la larve restent à élucider.

L'angle de contact entre l'adhésif et le substrat, ainsi qu'entre l'adhésif et la coquille est obtus, formant une structure concave entre la coquille et le substrat. Cette observation pourrait indiquer que la

répartition de l'adhésif sous la larve se fait par capillarité et par interactions hydrophobes. Chez *O. edulis*, il est proposé que la répartition de l'adhésif sous la larve fasse intervenir un comportement particulier. La larve d'*O. edulis* sécréterait l'adhésif en position verticale, et glisserait ensuite par une contraction valvaire sur l'adhésif. Le manteau interviendrait ensuite pour sécréter un adhésif complémentaire et finaliserait l'adhésion. Ce comportement n'a pas été observé chez *C. gigas*, et une répartition par phénomènes physiques de l'adhésif semble plus probable. Il serait intéressant d'étudier l'adhésion de la larve d'huître de *C. gigas* sur des substrats fonctionnalisés présentant des tensions de surface différentes comme cela a été réalisé sur les spores de l'algue *Ulva linza* (Callow *et al.*, 2005). L'utilisation de substrat présentant un panel d'hydrophobicité pourrait être employée afin de visualiser l'angle de contact entre l'adhésif et le substrat ce qui pourrait permettre de définir les caractéristiques physiques de ce bioadhésif. **Afin de déterminer plus précisément les mécanismes physico-chimiques mis en œuvre dans l'adhésif de *C. gigas*, l'étude de paramètres à l'interface de la surface lors de la sécrétion (pH, déplacement d'ions) serait nécessaire.**

D'autre part, chez la larve pédivéligère de *C. gigas*, nous avons observé dans le chapitre III que le pied s'étale durant quelques minutes devant la larve avant la sécrétion de l'adhésif permanent. Le rôle de ce changement de morphologie n'a pas été identifié. Il est probable que des sécrétions interviennent lors de cette étape permettant une « préparation » du substrat avant la sécrétion de l'adhésif. Cette étape pourrait contribuer à une répartition homogène de l'adhésif autour de la larve. Il est possible que la préparation du substrat avant l'adhésion fasse intervenir la sécrétion de lipides. En effet, l'importance des lipides dans les bioadhésifs a récemment été mise en évidence chez le gecko (Jain *et al.*, 2015), ainsi que chez des organismes marins : la larve *cypris* (Gohad *et al.*, 2014), la balane adulte (Fears *et al.*, 2018), et dans le byssus de la moule *M. galloprovincialis* (He *et al.*, 2018b). **Les lipides n'ont jamais été étudiés dans l'adhésion des larves pédivéligères de mollusques bivalves, et pourraient jouer un rôle lors du dépôt de l'adhésif permanent en modifiant l'état de surface, par exemple par l'apport de molécules à caractère hydrophobe voire hydrophile, selon la nature chimique des lipides qui seraient potentiellement impliqués.**

4.3.2 Deux structures physiques au sein de l'adhésif

Les observations en MEB ont mis en évidence la présence de deux structures différentes dans l'adhésif de *C. gigas*, entre les zones interne et externe. Le maillage de fibres adhésives très serré observé dans la zone externe de l'adhésif pourrait résulter d'une cohésion ionique et/ou d'une réticulation des protéines plus importante que dans la zone interne de l'adhésif. Si les interactions ioniques sont prépondérantes dans l'adhésif de *C. gigas*, il est probable que la zone externe, au contact direct de l'eau de mer, puisse bénéficier d'un apport en ions plus important permettant une cohésion plus importante. Cependant, lors de l'analyse EDX, aucune différence majeure dans la composition

élémentaire entre la zone externe et interne de l'adhésif n'a été observée. Chez *O. edulis*, les différences de structures dans l'adhésif sembleraient résulter d'une origine différente parmi les glandes du pied et donc d'une composition différente (Cranfield, 1973c, 1974, 1975). Chez *C. gigas*, l'identification du rôle des différentes glandes du pied n'a pas été assez développée pour statuer sur cette hypothèse. Cependant, la décharge massive et rapide de l'adhésif lors de l'adhésion ne semble pas indiquer l'intervention de glandes spécifiques dans l'établissement de ces structures. En revanche, l'autofluorescence de la zone interne et externe est différente (données non présentées), indiquant probablement une différence de composition, sans qu'il soit possible de conclure. **La raison de la différence de structure entre les deux zones de l'adhésif reste inconnue. Cet aspect de l'adhésif de *C. gigas* devrait être étudié plus en détail. En effet, il indique que la larve est capable de produire un bioadhésif intégrant une composition et des réactions biochimiques permettant de moduler le maillage de cette matrice extracellulaire, et ceci de manière précise. Ces mécanismes présentent un intérêt dans le domaine des biomatériaux, où la confection de matrices tridimensionnelles de structure précise, modulant les propriétés mécaniques, est essentielle.**

5 Relations entre adhésif et environnement

La nature protéique de l'adhésif sécrété par la larve pédivéligère de *Crassostrea gigas* en fait une matrice potentiellement sensible à l'oxydation, à la dégradation bactérienne, aux variations de température et de pH.

Cependant, les observations menées sur des larves âgées de 72 jours ont montré que l'adhésif sécrété lors de l'adhésion au stade pédivéligère était visuellement intact (données non présentées). Ces observations ont également été relevées chez *C. virginica* après 6 mois (Tibabuzo Perdomo *et al.*, 2018). Parmi les gènes et protéines impliqués dans l'adhésion *C. gigas*, des séquences ont été attribuées à la protection de l'adhésif. Ainsi, des enzymes oxydo-réductrices interviennent probablement dans la protection de l'adhésif contre l'oxydation. Les enzymes anti-protéases limitent également la dégradation de cette matrice par les microorganismes. D'autre part, il est probable que des molécules antimicrobiennes soient intégrées au sein de l'adhésif sécrété. Lors de l'analyse protéique des empreintes d'adhésifs, la majorité des protéines détectées sont des protéines cellulaires, parmi lesquelles des histones ont été identifiées. Des études ont révélé le potentiel rôle des histones dans les systèmes immunitaires innés (De Zoysa *et al.*, 2009; Kawasaki and Iwamuro, 2008). Le rôle antimicrobien des histones a également été proposé dans l'adhésif de l'oursin (Lebesgue *et al.*, 2016). Bien qu'hypothétique, il est probable que la présence de ces protéines au sein de l'adhésif puisse participer à sa résistance face à la dégradation bactérienne.

D'autre part, l'efficacité de l'adhésif de *C. gigas* est probablement en lien avec l'aire de répartition de l'espèce *C. gigas* ainsi que sa période de reproduction. L'adhésif de *C. gigas* est sécrété lors de la période estivale, lorsque la température de l'eau est généralement comprise entre 20 et 25°C. Chez la moule, le byssus perd en résistance durant les mois de mai à septembre. Cette diminution d'efficacité permet de mettre en évidence une probable sensibilité du byssus à la température, ou bien la production d'un filament de byssus de moindre qualité, dépendant d'une allocation d'énergie variable au cours de l'année (Carrington *et al.*, 2015; Moeser and Carrington, 2006; Moeser *et al.*, 2006). **Il est donc possible que les propriétés et la qualité de l'adhésif sécrété par la larve de *C. gigas* puissent varier selon la température.**

D'autre part, nous avons vu que des mécanismes d'oxydo-réduction et des interactions ioniques pourraient prendre part de manière importante à l'adhésion de la larve pédivéligère de *C. gigas*. Ce type de liaisons est sensible au pH, qui va définir l'activité des enzymes et la disponibilité des groupements ioniques. Chez la moule *Mytilus trossulus*, l'étude de O'Donnell *et al.* (2013) a montré en conditions *in vivo* un impact direct de l'acidification de l'eau de mer sur la résistance du filament de byssus. **Les performances de l'adhésif de la larve pédivéligère de *C. gigas* pourraient être impactées par les variations de pH de l'environnement.**

Ces observations indiquent que les bioadhésifs marins pourraient être impactés par les changements climatiques globaux. En revanche, la très grande adaptabilité de *C. gigas* aux conditions environnementales et sa large aire de répartition, semblent indiquer que le bioadhésif produit au stade larvaire présente une grande efficacité, dans des situations variées.

6 Conclusion

Mes travaux de thèse ont permis d'étudier le phénomène d'adhésion chez la larve pédivéligère de *C. gigas* qui n'avaient à ce jour jamais été documentés. Ainsi, des points principaux ont été identifiés :

- La larve pédivéligère de *C. gigas* présente un organe spécifiquement dédié à l'adhésion : le pied. Cet organe cilié permet l'exploration du substrat (le *crawling*) et la biosynthèse de bioadhésifs avant la métamorphose.
- Le pied se compose de quatre groupes de glandes contenant des mélanges bioadhésifs de diverses natures. Les glandes présentant un contenu polysaccharidique interviennent lors du *crawling*, permettant l'adhésion réversible. La glande la plus importante du pied, de nature protéique, sécrète l'adhésif permanent avant la métamorphose.
- L'adhésif permanent sécrété par la larve pédivéligère de *C. gigas* est composé de fibres qui seraient en grande partie de nature protéique.

- Une protéine de type collagène, contenant des domaines von Willebrand Factor de type A entre probablement dans la composition de l'adhésif. D'autres protéines, présentant des domaines typiques des protéines adhésives (*C-type lectin*, *EGF*, *Calcium binding site*) ont également été identifiées.
- Les interactions ioniques participeraient probablement à des mécanismes de cohésion de la matrice au sein de l'adhésif de *C. gigas*.

Ces résultats permettent maintenant d'aborder l'adhésion chez la larve pédivéligère de *C. gigas* avec une base solide de connaissances. Pour la première fois chez les mollusques bivalves, des protéines candidates potentiellement impliquées dans l'adhésion au stade pédivéligère ont été identifiées. La poursuite de cette étude impliquerait donc de valider ou d'invalidier les hypothèses formulées concernant ces protéines. La localisation cellulaire de ces séquences est donc essentielle afin de décrire précisément les molécules impliquées dans l'adhésion de la larve pédivéligère de *C. gigas*. Ceci pourrait être rendu possible grâce au développement des outils « omiques », et des technologies récentes de microscopie en super-résolution.

Enfin, la somme de connaissances acquises durant la thèse pourrait servir de base pour le développement futur de colles dites de « nouvelle génération », non toxiques, dépourvues de solvant organique et actives en milieu aqueux. La reproductibilité parfaite des bioadhésifs se heurte actuellement à la complexité de ces matrices et aux modifications post traductionnelles, souvent multiples et essentielles des protéines bioadhésives. Cependant, ces colles de nouvelle génération pourraient combiner l'action de certaines enzymes identifiées comme intervenant potentiellement lors de l'adhésion de la larve de *C. gigas* (oxydo-réductases, phosphorylases, isomérases, etc.) avec un(des) substrat(s) approprié(s). Le frein technologique apparaît surmontable car les développements actuels du génie enzymatique permettant de réaliser des structures enzymatiques « à façon » par des micro-organismes génétiquement modifiés. Ce type de développement est d'ores et déjà envisagé à partir des mécanismes d'oxydo-réduction intervenant avec les groupements DOPA dans le byssus de moule. La combinaison de stratégies adhésives mécaniques et chimiques identifiées chez les organismes vivants peut aussi être envisagée. Par exemple, la confection de substrats microstructurés s'inspirant de l'adhésion mécanique réversible des cils (pied des larves pédivéligère, gecko), auxquels des groupements chimiques adhésifs seraient greffés en surface, pourrait permettre de répondre à une demande en bioadhésif innovants croissante et variée dans de nombreux domaines.

Bibliographie

Adlassnig, W., Lendl, T., Peroutka, M., and Lang, I. (2010). Deadly glue - adhesive traps of carnivorous plants. In *Biological Adhesive Systems*, (Springer), pp. 15–28.

Ai, J., Tan, Y., Ying, W., Hong, Y., Liu, S., Wu, M., Qian, X., and Wang, H. (2006). Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by laser capture microdissection. *Proteomics* 6, 538–546.

Albertin, C.B., Simakov, O., Mitros, T., Wang, Z.Y., Pungor, J.R., Edsinger-Gonzales, E., Brenner, S., Ragsdale, C.W., and Rokhsar, D.S. (2015). The octopus genome and the evolution of cephalopod neural and morphological novelties. *Nature* 524, 220.

Aldred, N., and Clare, A.S. (2008). The adhesive strategies of cyprids and development of barnacle-resistant marine coatings. *Biofouling* 24, 351–363.

Aldred, N., and Petrone, L. (2016). Progress in the study of adhesion by marine invertebrate larvae. In *Biological Adhesives*, A.M. Smith, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 87–105.

Aldred, N., Ekblad, T., Andersson, O., Liedberg, B., and Clare, A.S. (2011). Real-time quantification of microscale bioadhesion events *in situ* using imaging Surface Plasmon Resonance (iSPR). *ACS Appl. Mater. Interfaces* 3, 2085–2091.

Aldred, N., Høeg, J.T., Maruzzo, D., and Clare, A.S. (2013a). Analysis of the behaviours mediating barnacle cyprid reversible adhesion. *PLoS ONE* 8, e68085.

Aldred, N., Gohad, N.V., Petrone, L., Orihuela, B., Liedberg, B., Ederth, T., Mount, A., Rittschof, D., and Clare, A.S. (2013b). Confocal microscopy-based goniometry of barnacle cyprid permanent adhesive. *J. Exp. Biol.* 216, 1969–1972.

Alfaro, A.C., Young, T., and Ganesan, A.M. (2011). Regulatory effects of mussel (*Aulacomya maoriana* Iredale 1915) larval settlement by neuroactive compounds, amino acids and bacterial biofilms. *Aquaculture* 322, 158–168.

Almagro Armenteros, J.J., Sønderby, C.K., Sønderby, S.K., Nielsen, H., and Winther, O. (2017). DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics* 33, 3387–3395.

Álvarez Nogal, R., and Molist García, P. (2015). The outer mantle epithelium of *Haliotis tuberculata* (Gastropoda Haliotidae): an ultrastructural and histochemical study using lectins. *Acta Zool.* 96, 452–459.

Anderson, K.E., and Waite, J.H. (2002). Biochemical characterization of a byssal protein from *Dreissena bugensis* (Andrusov). *Biofouling* 18, 37–45.

Andrade, G.R., Araújo, J.L.F. de, Nakamura Filho, A., Guañabens, A.C.P., Carvalho, M.D. de, and Cardoso, A.V. (2015). Functional surface of the golden mussel's foot: morphology, structures and the role of cilia on underwater adhesion. *Mater. Sci. Eng. C* 54, 32–42.

Anlar, B., and Gunel-Ozcan, A. (2012). Tenascin-R: role in the central nervous system. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 1385–1389.

Aouf, C., Lecomte, J., Villeneuve, P., Dubreucq, E., and Fulcrand, H. (2012). Chemo-enzymatic functionalization of gallic and vanillic acids: synthesis of bio-based epoxy resins prepolymers. *Green Chem.* *14*, 2328–2336.

Arakawa, K.Y. (1990). Natural spat collecting in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Mar. Freshw. Behav. Phy* *17*, 95–128.

Arnou, L.E. (1937). Colorimetric determination of the components of 3, 4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures. *J Biol Chem* *118*, 531–537.

Audino, J.A., Marian, J.E.A.R., Wanninger, A., and Lopes, S.G.B.C. (2015). Mantle margin morphogenesis in *Nodipecten nodosus* (Mollusca: Bivalvia): new insights into the development and the roles of bivalve pallial folds. *BMC Dev. Biol.* *15*.

Autumn, K., Liang, Y.A., Hsieh, S.T., Zesch, W., Chan, W.P., Kenny, T.W., Fearing, R., and Full, R.J. (2000). Adhesive force of a single gecko foot-hair. *Nature* *405*, 681.

Autumn, K., Dittmore, A., Santos, D., Spenko, M., and Cutkosky, M. (2006). Frictional adhesion: a new angle on gecko attachment. *J. Exp. Biol.* *209*, 3569–3579.

Bailly, L. (2015). Caractérisation moléculaire et isotopique de goudrons et résines archéologiques dérivés de conifères en contexte maritime.

Barker, P.W. (1940). Rubber: history, production, and manufacture (USGPO).

Barlow, D.E., and Wahl, K.J. (2012). Optical spectroscopy of marine bioadhesive interfaces. *Annu. Rev. Anal. Chem.* *5*, 229–251.

Barlow, D., Dickinson, G., Orihuela, B., Rittschof, D., and Wahl, K. (2009). In situ ATR–FTIR characterization of primary cement interfaces of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Biofouling* *25*, 359–366.

Barnes, H., and Blackstock, J. (1974). The biochemical composition of the cement of a pedunculate cirripede. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* *16*, 87–91.

Bartlett, M.D., Croll, A.B., and Crosby, A.J. (2012). Designing bio-inspired adhesives for shear loading: from simple structures to complex patterns. *Adv. Funct. Mater.* *22*, 4985–4992.

Bayne, B.L. (2017). *Biology of Oysters* (Elsevier Science).

Bayne, B., Ahrens, M., Allen, S., D’auriac, M.A., Backeljau, T., Beninger, P., Bohn, R., Boudry, P., Davis, J., and Green, T. (2017). The proposed dropping of the genus *Crassostrea* for all pacific cupped oysters and its replacement by a new genus *Magallana*: a dissenting view. *J. Shellfish Res.* *36*, 545–547.

Bayne, B., d’Auriac, M.A., Backeljau, T., Beninger, P., Boudry, P., Carnegie, R., Davis, J., Guo, X., Hedgecock, D., and Krause, M. (2018). A scientific name for Pacific oysters. *Aquaculture*.

Becker, P.T., Lambert, A., Lejeune, A., Lanterbecq, D., and Flammang, P. (2012). Identification, characterization, and expression levels of putative adhesive proteins from the tube-dwelling polychaete *Sabellaria alveolata*. *Biol. Bull.* *223*, 217–225.

Benedict, C.V., and Waite, J.H. (1986). Composition and ultrastructure of the byssus of *Mytilus edulis*. *J. Morphol.* *189*, 261–270.

-
- Berglin, M., Delage, L., Potin, P., Vilter, H., and Elwing, H. (2004). Enzymatic cross-linking of a phenolic polymer extracted from the marine alga *Fucus serratus*. *Biomacromolecules* 5, 2376–2383.
- Bernard, I., Massabuau, J., Ciret, P., Sow, M., Sottolichio, A., Pouvreau, S., and Tran, D. (2016). In situ spawning in a marine broadcast spawner, the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Timing and environmental triggers. *Limnol. Oceanogr.* 61, 635–647.
- Betz, O. (2010). Adhesive exocrine glands in insects: morphology, ultrastructure, and adhesive secretion. In *Biological Adhesive Systems*, (Springer), pp. 111–152.
- Bhushan, B. (2009). *Biomimetics: lessons from nature – an overview*.
- Blank, S., Arnoldi, M., Khoshnavaz, S., Treccani, L., Kuntz, M., Mann, K., Grathwohl, G., and Fritz, M. (2003). The nacre protein perlucin nucleates growth of calcium carbonate crystals. *J. Microsc.* 212, 280–291.
- Bonar, D.B., Coon, S.L., Walch, M., Weiner, R.M., and Fitt, W. (1990). Control of oyster settlement and metamorphosis by endogenous and exogenous chemical cues. *Bull. Mar. Sci.* 46, 484–498.
- Boudry, P. (2009). Genetic variation and selective breeding in hatchery-propagated molluscan shellfish. In *New Technologies in Aquaculture*, (Elsevier), pp. 87–108.
- Boullot, F., Castrec, J., Bidault, A., Dantas, N., Payton, L., Perrigault, M., Tran, D., Amzil, Z., Boudry, P., Soudant, P., *et al.* (2017). Molecular characterization of voltage-gated sodium channels and their relations with paralytic shellfish toxin bioaccumulation in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Drugs* 15, 21.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Braze, S.L., and Carrington, E. (2006). Interspecific comparison of the mechanical properties of mussel byssus. *Biol. Bull.* 211, 263–274.
- Buffet, J.-P., Corre, E., Duvernois-Berthet, E., Fournier, J., and Lopez, P.J. (2018). Adhesive gland transcriptomics uncovers a diversity of genes involved in glue formation in marine tube-building polychaetes. *Acta Biomater.* 72, 316–328.
- Buhmann, M.T., Poulsen, N., Klemm, J., Kennedy, M.R., Sherrill, C.D., and Kröger, N. (2014). A tyrosine-rich cell surface protein in the diatom *Amphora coffeaeformis* identified through transcriptome analysis and genetic transformation. *PLoS One* 9, e110369.
- Burke, R.D. (1986). Pheromones and the gregarious settlement of marine invertebrate larvae. *Bull. Mar. Sci.* 39, 323–331.
- Burkett, J.R., Hight, L.M., Kenny, P., and Wilker, J.J. (2010). Oysters produce an organic–inorganic adhesive for intertidal reef construction. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 12531–12533.
- Burkhard, P., Stetefeld, J., and Strelkov, S.V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* 11, 82–88.
- von Byern, J., Grunwald, I., Kosok, M., Saporito, R.A., Dicke, U., Wetjen, O., Thiel, K., Borcharding, K., Kowalik, T., and Marchetti-Deschmann, M. (2017). Chemical characterization of the adhesive secretions of the salamander *Plethodon shermani* (Caudata, Plethodontidae). *Sci. Rep.* 7, 6647.

- Callow, J.A., and Callow, M.E. (2006). The *Ulva* spore adhesive system. In *Biological Adhesives*, (Springer), pp. 63–78.
- Callow, J.A., and Callow, M.E. (2011). Trends in the development of environmentally friendly fouling-resistant marine coatings. *Nat. Commun.* 2, 244.
- Callow, J.A., Stanley, M.S., Wetherbee, R., and Callow, M.E. (2000a). Cellular and molecular approaches to understanding primary adhesion in *Enteromorpha*: an overview. *Biofouling* 16, 141–150.
- Callow, J.A., Crawford, S.A., Higgins, M.J., Mulvaney, P., and Wetherbee, R. (2000b). The application of atomic force microscopy to topographical studies and force measurements on the secreted adhesive of the green alga *Enteromorpha*. *Planta* 211, 641–647.
- Callow, J.A., Callow, M.E., Ista, L.K., Lopez, G., and Chaudhury, M.K. (2005). The influence of surface energy on the wetting behaviour of the spore adhesive of the marine alga *Ulva linza*; (synonym *Enteromorpha linza*). *J. R. Soc. Interface* 2, 319–325.
- Callow, M.E., Callow, J.A., Pickett-Heaps, J.D., and Wetherbee, R. (1997). Primary adhesion of *Enteromorpha* (Chlorophyta, Ulvales) propagules: quantitative settlement studies and video microscopy. *J. Phycol.* 33, 938–947.
- Carrington, E., Waite, J.H., Sara, G., and Sebens, K.P. (2015). Mussels as a model system for integrative ecomechanics. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 7, 443–469.
- Casoli, E., Bonifazi, A., Ardizzone, G., and Gravina, M.F. (2016). How algae influence sessile marine organisms: The tube worms case of study. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 178, 12–20.
- Chiu, V.K., Bivona, T., Hach, A., Sajous, J.B., Silletti, J., Wiener, H., Johnson II, R.L., Cox, A.D., and Philips, M.R. (2002). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat. Cell Biol.* 4, 343.
- Collin, A., Dubois, S., Ramambason, C., and Etienne, S. (2018). Very high-resolution mapping of emerging biogenic reefs using airborne optical imagery and neural network: the honeycomb worm (*Sabellaria alveolata*) case study. *Int. J. Remote Sens.* 1–16.
- Coon, S.L., Bonar, D.B., and Weiner, R.M. (1985). Induction of settlement and metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), by L-DOPA and catecholamines. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 94, 211–221.
- Coon, S.L., Fitt, W.K., and Bonar, D.B. (1990). Competence and delay of metamorphosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 106, 379–387.
- Costa, P.M., and Costa, M.H. (2012). Development and application of a novel histological multichrome technique for clam histopathology. *J. Invertebr. Pathol.* 110, 411–414.
- Cranfield, H.J. (1973a). A study of the morphology, ultrastructure, and histochemistry of the foot of the pediveliger of *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.* 22, 187–202.
- Cranfield, H.J. (1973b). Observations on the behaviour of the pediveliger of *Ostrea edulis* during attachment and cementing. *Mar. Biol.* 22, 203–209.
- Cranfield, H.J. (1973c). Observations on the function of the glands of the foot of the pediveliger of *Ostrea edulis* during settlement. *Mar. Biol.* 22, 211–223.

-
- Cranfield, H.J. (1974). Observations on the morphology of the mantle folds of the pediveliger of *Ostrea edulis* L. and their function during settlement. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* *54*, 1–12.
- Cranfield, H.J. (1975). The ultrastructure and histochemistry of the larval cement of *Ostrea edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* *55*, 497–503.
- Craven, R.A., and Banks, R.E. (2001). Laser capture microdissection and proteomics: possibilities and limitation. *PROTEOMICS Int. Ed.* *1*, 1200–1204.
- Daniel, G., Chamberlain, A., and Jones, E. (1987). Cytochemical and electron microscopical observations on the adhesive materials of marine fouling diatoms. *Br. Phycol. J.* *22*, 101–118.
- Davies, M.S., and Hawkins, S. (1998). Mucus from marine molluscs. In *Advances in Marine Biology*, (Elsevier), pp. 1–71.
- De Gregorio, B.T., Stroud, R.M., Burden, D.K., Fears, K.P., Everett, R.K., and Wahl, K.J. (2015). Shell structure and growth in the base plate of the Barnacle *Amphibalanus amphitrite*. *ACS Biomater. Sci. Eng.* *1*, 1085–1095.
- De Mestral, G. (1955). Velvet type fabric and method of producing same.
- De Zoysa, M., Nikapitiya, C., Whang, I., Lee, J.-S., and Lee, J. (2009). Abhisin: a potential antimicrobial peptide derived from histone H2A of disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Fish Shellfish Immunol.* *27*, 639–646.
- Delius, G., and Tatro, C.P. (1912). Process for protecting ships from barnacles.
- DeMoor, S., Waite, H.J., Jangoux, M.J., and Flammang, P.J. (2003). Characterization of the adhesive from Cuvierian tubules of the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea). *Mar. Biotechnol.* *5*, 45–57.
- Dermit, M., Dodel, M., and Mardakheh, F.K. (2017). Methods for monitoring and measurement of protein translation in time and space. *Mol. Biosyst.* *13*, 2477–2488.
- Dheilly, N.M., Lelong, C., Huvet, A., Kellner, K., Dubos, M.-P., Riviere, G., Boudry, P., and Favrel, P. (2012). Gametogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: a microarrays-based analysis identifies sex and stage specific genes. *PLoS One* *7*, e36353.
- Dickinson, G.H., Yang, X., Wu, F., Orihuela, B., Rittschof, D., and Beniash, E. (2016). Localization of phosphoproteins within the barnacle adhesive interface. *Biol. Bull.* *230*, 233–242.
- Dimartino, S., Savory, D.M., Fraser-Miller, S.J., Gordon, K.C., and McQuillan, A.J. (2016). Microscopic and infrared spectroscopic comparison of the underwater adhesives produced by germlings of the brown seaweed species *Durvillaea antarctica* and *Hormosira banksii*. *J. R. Soc. Interface* *13*, 20151083.
- Jing Ding, J., Huang, B., Qiang Hu, Y., and Bing Wang, X. (2017). The effects of different monospecific benthic diatoms on larval settlement, metamorphosis, survival, and growth of *Haliotis asinina* Linnaeus in the South China Sea. *Aquac. Int.* *25*, 367–377.
- Dodou, D., Breedveld, P., De Winter, J., Dankelman, J., and van Leeuwen, J. (2011). Mechanisms of temporary adhesion in benthic animals. *Biol. Rev.* *86*, 15–32.

- Dou, H., Miao, Y., Li, Y., Li, Y., Dai, X., Zhang, X., Liang, P., Liu, W., Wang, S., and Bao, Z. (2018). Characterization of Chiton *Ischnochiton hakodadensis* foot based on transcriptome sequencing. *J. Ocean Univ. China* *17*, 632–640.
- Dreanno, C., Kirby, R.R., and Clare, A.S. (2006a). Smelly feet are not always a bad thing: the relationship between cyprid footprint protein and the barnacle settlement pheromone. *Biol. Lett.* *2*, 423–425.
- Dreanno, C., Matsumura, K., Dohmae, N., Takio, K., Hirota, H., Kirby, R.R., and Clare, A.S. (2006b). An α 2-macroglobulin-like protein is the cue to gregarious settlement of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 14396–14401.
- Drickamer, K. (1999). C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *9*, 585–590.
- Eckroat, L.R., Masteller, E., Shaffer, J., and Steele, L. (1993). The byssus of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): morphology, byssal thread formation and detachment. *Zebra Mussels Biol. Impacts Control* 239–263.
- Elston, R. (1980). Functional anatomy, histology and ultrastructure of the soft tissues of the larval American oyster *Crassostrea virginica*. *Proc Nation Shellfish Assoc* *70*, 65–93.
- Enriquez-Diaz, M., Volland, J., Chavez-Villegas, J., Aldana-Aranda, D., and Gros, O. (2015). Development of the planktotrophic veligers and plantigrades of *Strombus pugilis* (Gastropoda). *J. Molluscan Stud.* *81*, 335–344.
- Espinosa, E.P., Koller, A., and Allam, B. (2016). Proteomic characterization of mucosal secretions in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Proteomics* *132*, 63–76.
- Evseev, G., Yakovlev, Y.M., and Li, X. (1996). The anatomy of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thurnberg)(Bivalvia: Ostreidae).
- Fabioux, C., Pouvreau, S., Roux, F.L., and Huvet, A. (2004). The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *315*, 897–904.
- Fears, K.P., Orihuela, B., Rittschof, D., and Wahl, K.J. (2018). Acorn barnacles secrete phase-separating fluid to clear surfaces ahead of cement deposition. *Adv. Sci.* 1700762.
- Federle, W., Riehle, M., Curtis, A.S., and Full, R.J. (2002). An integrative study of insect adhesion: mechanics and wet adhesion of pretarsal pads in ants. *Integr. Comp. Biol.* *42*, 1100–1106.
- Ferreira, P., Gil, H., and Alves, P. (2013). An overview in surgical adhesives. *Recent Adv. Adhes. Res.* 59–85.
- Field, L.M., Fagerberg, W.R., and Böttger, S.A. (2018). Survey for the presence of a vitronectin-like protein in micro-and macroalgae and cyanobacteria. *J. Phycol.* *54*, 299–303.
- Filippidi, E., DeMartini, D.G., de Molina, P.M., Danner, E.W., Kim, J., Helgeson, M.E., Waite, J.H., and Valentine, M.T. (2015). The microscopic network structure of mussel (*Mytilus*) adhesive plaques. *J. R. Soc. Interface* *12*, 20150827.
- Finn, R.D., Attwood, T.K., Babbitt, P.C., Bateman, A., Bork, P., Bridge, A.J., Chang, H.-Y., Dosztányi, Z., El-Gebali, S., and Fraser, M. (2016). InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Res.* *45*, D190–D199.

-
- Fischer, G. (1994). Peptidyl-prolyl cis/trans isomerases and their effectors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *33*, 1415–1436.
- Fitt, W., Coon, S., Walch, M., Weiner, R., Colwell, R., and Bonar, D. (1990). Settlement behavior and metamorphosis of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in response to bacterial supernatants. *Mar. Biol.* *106*, 389–394.
- Flammang, P., Michel, A., Cauwenberge, A.V., Alexandre, H., and Jangoux, M. (1998). A study of the temporary adhesion of the podia in the sea star *Asterias rubens* (Echinodermata, Asteroidea) through their footprints. *J. Exp. Biol.* *201*, 2383–2395.
- Flammang, P., Ribesse, J., and Jangoux, M. (2002). Biomechanics of adhesion in sea cucumber Cuvierian tubules (Echinodermata, Holothuroidea). *Integr. Comp. Biol.* *42*, 1107–1115.
- Flammang, P., Lambert, A., Bailly, P., and Hennebert, E. (2009). Polyphosphoprotein-containing marine adhesives. *J. Adhes.* *85*, 447–464.
- Flammang, P., Demeuldre, M., Hennebert, E., and Santos, R. (2016). Adhesive secretions in echinoderms: a review. In *Biological Adhesives*, (Springer), pp. 193–222.
- Flemming, H.-C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 623.
- Forbes, M., and Hallam, N. (1979). Embryogenesis and substratum adhesion in the brown alga *Hormosira banksi* (Turner) Decaisne. *Br. Phycol. J.* *14*, 69–81.
- Foulon, V., Artigaud, S., Buscaglia, M., Bernay, B., Fabioux, C., Petton, B., Elies, P., Boukerma, K., Hellio, C., Guérard, F., *et al.* (2018). Proteinaceous secretion of bioadhesive produced during crawling and settlement of *Crassostrea gigas* larvae. *Sci. Rep.* *8*, 15298.
- Gabe, M. (1968). *Techniques histologiques* (Masson Paris).
- Gadhve, R.V., Mahanwar, P.A., and Gadekar, P.T. (2017). Starch-based adhesives for wood/wood composite bonding. *Open J. Polym. Chem.* *7*, 19.
- Galtsoff, P.S. (1964). The american oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fish Bull* *64*, 421–425.
- Gao, Z., Bremer, P.J., Barker, M.F., Tan, E.W., and McQuillan, A.J. (2007). Adhesive secretions of live mussels observed in situ by attenuated total reflection–infrared spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* *61*, 55–59.
- Geim, A.K., Dubonos, S., Grigorieva, I., Novoselov, K., Zhukov, A., and Shapoval, S.Y. (2003). Microfabricated adhesive mimicking gecko foot-hair. *Nat. Mater.* *2*, 461.
- Gerdol, M., Fujii, Y., Hasan, I., Koike, T., Shimojo, S., Spazzali, F., Yamamoto, K., Ozeki, Y., Pallavicini, A., and Fujita, H. (2017). The purplish bifurcate mussel *Mytilisepta virgata* gene expression atlas reveals a remarkable tissue functional specialization. *BMC Genomics* *18*, 590.
- Gohad, N.V., Aldred, N., Orihuela, B., Clare, A.S., Rittschof, D., and Mount, A.S. (2012). Observations on the settlement and cementation of barnacle (*Balanus amphitrite*) cyprid larvae after artificial exposure to noradrenaline and the locations of adrenergic-like receptors. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* *416–417*, 153–161.

- Gohad, N.V., Aldred, N., Hartshorn, C.M., Jong Lee, Y., Cicerone, M.T., Orihuela, B., Clare, A.S., Rittschof, D., and Mount, A.S. (2014). Synergistic roles for lipids and proteins in the permanent adhesive of barnacle larvae. *Nat. Commun.* 5.
- Gonçalves, J.T., and Stühmer, W. (2010). Calmodulin interaction with hEAG1 visualized by FRET microscopy. *PLoS One* 5, e10873.
- Gricourt, L., Bonnec, G., Boujard, D., Mathieu, M., and Kellner, K. (2003). Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrIGF-1 effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 134, 44–56.
- Grizel, H., and Héral, M. (1991). Introduction into France of the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). *ICES J. Mar. Sci.* 47, 399–403.
- Gruet, Y., Vovelle, J., and Grasset, M. (1987). Composante biominérale du ciment du tube chez *Sabellaria alveolata* (L.), Annélide Polychète. *Can. J. Zool.* 65, 837–842.
- Gruffydd, L.D., Lane, D.J.W., and Beaumont, A.R. (1975). The glands of the larval foot in *Pecten maximus* L. and possible homologues in other bivalves. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 55, 463–476.
- Hadfield, M.G. (2011). Biofilms and marine invertebrate larvae: what bacteria produce that larvae use to choose settlement sites. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 3, 453–470.
- Hall, R.A., Premont, R.T., Chow, C.-W., Blitzer, J.T., Pitcher, J.A., Claing, A., Stoffel, R.H., Barak, L.S., Shenolikar, S., and Weinman, E.J. (1998). The β 2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange. *Nature* 392, 626.
- Harada, N., Iijima, S., Kobayashi, K., Yoshida, T., Brown, W.R., Hibi, T., Oshima, A., and Morikawa, M. (1997). Human IgGFc binding protein (FcγBP) in colonic epithelial cells exhibits mucin-like structure. *J. Biol. Chem.* 272, 15232–15241.
- Harp, S.L. (2015). *A world history of rubber: empire, industry, and the everyday* (John Wiley & Sons).
- Harrington, M.J., and Waite, J.H. (2007). Holdfast heroics: comparing the molecular and mechanical properties of *Mytilus californianus* byssal threads. *J. Exp. Biol.* 210, 4307–4318.
- He, L.-S., Zhang, G., Wang, Y., Yan, G.-Y., and Qian, P.-Y. (2018a). Toward understanding barnacle cementing by characterization of one cement protein-100kDa in *Amphibalanus amphitrite*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495, 969–975.
- He, Y., Sun, C., Jiang, F., Yang, B., Li, J., Zhong, C., Zheng, L., and Ding, H. (2018b). Lipids as integral components in mussel adhesion. *Soft Matter* 14, 7145–7154.
- Hennebert, E., Wattiez, R., and Flammang, P. (2011). Characterisation of the carbohydrate fraction of the temporary adhesive secreted by the tube feet of the sea star *Asterias rubens*. *Mar. Biotechnol.* 13, 484–495.
- Hennebert, E., Santos, R., and Flammang, P. (2012a). Echinoderms don't suck: evidence against the involvement of suction in tube foot attachment. *Zoosymposia* 7, 25–32.

-
- Hennebert, E., Wattiez, R., Waite, J.H., and Flammang, P. (2012b). Characterization of the protein fraction of the temporary adhesive secreted by the tube feet of the sea star *Asterias rubens*. *Biofouling* 28, 289–303.
- Hennebert, E., Maldonado, B., Ladurner, P., Flammang, P., and Santos, R. (2014a). Experimental strategies for the identification and characterization of adhesive proteins in animals: a review. *Interface Focus* 5, 20140064–20140064.
- Hennebert, E., Wattiez, R., Demeuldre, M., Ladurner, P., Hwang, D.S., Waite, J.H., and Flammang, P. (2014b). Sea star tenacity mediated by a protein that fragments, then aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 6317–6322.
- Hennebert, E., Leroy, B., Wattiez, R., and Ladurner, P. (2015). An integrated transcriptomic and proteomic analysis of sea star epidermal secretions identifies proteins involved in defense and adhesion. *J. Proteomics* 128, 83–91.
- Hesse, M. (2010). Bonding single pollen grains together: how and why? In *Biological Adhesive Systems*, (Springer), pp. 3–13.
- Hopkinson, B.M., Tansik, A.L., and Fitt, W.K. (2015). Internal carbonic anhydrase activity in the tissue of scleractinian corals is sufficient to support proposed roles in photosynthesis and calcification. *J. Exp. Biol.* jeb-118182.
- Huang, J., Zhang, C., Ma, Z., Xie, L., and Zhang, R. (2007). A novel extracellular EF-hand protein involved in the shell formation of pearl oyster. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* 1770, 1037–1044.
- Hull, W.Q., and Bangert, W.G. (1952). Animal glue. *Ind. Eng. Chem.* 44, 2275–2284.
- Hwang, D.S., and Waite, J.H. (2012). Three intrinsically unstructured mussel adhesive proteins, mfp-1, mfp-2, and mfp-3: Analysis by circular dichroism. *Protein Sci.* 21, 1689–1695.
- Inoue, K., Takeuchi, Y., Miki, D., and Odo, S. (1995). Mussel adhesive plaque protein gene is a novel member of epidermal growth factor-like gene family. *J. Biol. Chem.* 270, 6698–6701.
- Jackson, D.J., McDougall, C., Green, K., Simpson, F., Wörheide, G., and Degnan, B.M. (2006). A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell. *BMC Biol.* 4, 40.
- Jackson, S., Kelly, F., North, A., Randall, J., Seeds, W., Watson, M., Wilkinson, G., and Randall, J. (1953). The byssus threads of *Mytilus edulis* and *Pinna nobilis*. *Nat. Struct. Collagen Lond.* Butterworths 106–116.
- Jain, D., Stark, A.Y., Niewiarowski, P.H., Miyoshi, T., and Dhinojwala, A. (2015). NMR spectroscopy reveals the presence and association of lipids and keratin in adhesive gecko setae. *Sci. Rep.* 5, 9594.
- Jez, J.M., and Penning, T.M. (2001). The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chem. Biol. Interact.* 130, 499–525.
- Ji, P., Xu, F., Huang, B., Li, Y., Li, L., and Zhang, G. (2016). Molecular Characterization and Functional Analysis of a Putative Octopamine/Tyramine Receptor during the Developmental Stages of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *PloS One* 11, e0168574.
- Joly, J.-P., Bodoy, A., and Baud, J.-P. (1989). Guide du télécaptage de larves d’huîtres *Crassostrea gigas*.

- Jonker, J.-L., Morrison, L., Lynch, E.P., Grunwald, I., von Byern, J., and Power, A.M. (2015). The chemistry of stalked barnacle adhesive (*Lepas anatifera*). *Interface Focus* 5, 20140062.
- Kádár, E., and Bettencourt, R. (2008). Ultrastructural and molecular evidence for potentially symbiotic bacteria within the byssal plaques of the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiulus azoricus*. *Biometals* 21, 395–404.
- Kamino, K. (2001). Novel barnacle underwater adhesive protein is a charged amino acid-rich protein constituted by a Cys-rich repetitive sequence. *Biochem. J.* 356, 503–507.
- Kamino, K. (2016). Barnacle underwater attachment. In *Biological Adhesives*, (Springer), pp. 153–176.
- Kamino, K., Odo, S., and Maruyama, T. (1996). Cement proteins of the acorn-barnacle, *Megabalanus rosa*. *Biol. Bull.* 190, 403–409.
- Kamino, K., Inoue, K., Maruyama, T., Takamatsu, N., Harayama, S., and Shizuri, Y. (2000). Barnacle cement proteins importance of disulfide bonds in their insolubility. *J. Biol. Chem.* 275, 27360–27365.
- Kang, J.-H., Kondo, F., and Katayama, Y. (2006). Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 226, 79–89.
- Kawasaki, H., and Iwamuro, S. (2008). Potential roles of histones in host defense as antimicrobial agents. *Infect. Disord.-Drug Targets Former. Curr. Drug Targets-Infect. Disord.* 8, 195–205.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., and Sternberg, M.J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* 10, 845.
- Kennedy, V.S., Newell, R.I., and Eble, A.F. (1996). The eastern oyster: *Crassostrea virginica* (University of Maryland Sea Grant College).
- Kerschbaum, H.H., Donato, R., and Hermann, A. (1997). Annexin-immunoreactive proteins in the nervous system and eye of the gastropods, *Aplysia* and *Helix*. *Brain Res.* 746, 133–140.
- Kiani, C., Liwen, C., Wu, Y.J., Albert, J.Y., and Burton, B.Y. (2002). Structure and function of aggrecan. *Cell Res.* 12, 19.
- Kier, W.M., and Smith, A.M. (2002). The structure and adhesive mechanism of octopus suckers. *Integr. Comp. Biol.* 42, 1146–1153.
- Kim, S. (2010). The reduction of formaldehyde and VOCs emission from wood-based flooring by green adhesive using cashew nut shell liquid (CNSL). *J. Hazard. Mater.* 182, 919–922.
- King, D.R., Bartlett, M.D., Gilman, C.A., Irschick, D.J., and Crosby, A.J. (2014). Creating Gecko-Like adhesives for “Real world” surfaces. *Adv. Mater.* 26, 4345–4351.
- Knight-Jones, E., and Crisp, D. (1953). Gregariousness in barnacles in relation to the fouling of ships and to anti-fouling research. *Nature* 171, 1109.
- Koch, K., Bhushan, B., and Barthlott, W. (2009). Multifunctional surface structures of plants: an inspiration for biomimetics. *Prog. Mater. Sci.* 54, 137–178.
- Korringa, P. (1940). Experiments and observations on swarming, pelagic life and setting in the European flat oyster, *Ostrea edulis* L. (Amsterdam.).

-
- Kozowyk, P.R.B., Soressi, M., Pomstra, D., and Langejans, G.H.J. (2017). Experimental methods for the Palaeolithic dry distillation of birch bark: implications for the origin and development of Neandertal adhesive technology. *Sci. Rep.* 7, 8033.
- Lambuth, A.L. (2017). *Protein adhesives for wood*. (Routledge), pp. 17–46.
- Landry, T.D., Pauluhn, J., Daems, D., and Reimann, K. (2016). Polyurethane products in fires: acute toxicity of smoke and fire gases.
- Lane, D., and Nott, J. (1975). A study of the morphology, fine structure and histochemistry of the foot of the pediveliger of *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 55, 477–495.
- Lebesgue, N., da Costa, G., Ribeiro, R.M., Ribeiro-Silva, C., Martins, G.G., Matranga, V., Scholten, A., Cordeiro, C., Heck, A.J.R., and Santos, R. (2016). Deciphering the molecular mechanisms underlying sea urchin reversible adhesion: A quantitative proteomics approach. *J. Proteomics* 138, 61–71.
- Lee, H., Lee, B.P., and Messersmith, P.B. (2007). A reversible wet/dry adhesive inspired by mussels and geckos. *Nature* 448, 338.
- Leggat, P.A., Kedjarune, U., and Smith, D.R. (2004). Toxicity of cyanoacrylate adhesives and their occupational impacts for dental staff. *Ind. Health* 42, 207–211.
- Lengerer, B., and Ladurner, P. (2018). Properties of temporary adhesion systems of marine and freshwater organisms. *J. Exp. Biol.* 221, jeb182717.
- Li, J., Celiz, A., Yang, J., Yang, Q., Wamala, I., Whyte, W., Seo, B., Vasilyev, N., Vlassak, J., and Suo, Z. (2017). Tough adhesives for diverse wet surfaces. *Science* 357, 378–381.
- Li, S., Xia, Z., Chen, Y., Gao, Y., and Zhan, A. (2018). Byssus structure and protein composition in the highly invasive fouling mussel *Limnoperna fortunei*. *Front. Physiol.* 9.
- Li, X.-X., Yu, W.-C., Cai, Z.-Q., He, C., Wei, N., Wang, X.-T., and Yue, X.-Q. (2016). Molecular cloning and characterization of full-length cDNA of calmodulin gene from Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *BioMed Res. Int.* 2016.
- Liu, C., Li, S., Huang, J., Liu, Y., Jia, G., Xie, L., and Zhang, R. (2015). Extensible byssus of *Pinctada fucata*: Ca²⁺-stabilized nanocavities and a thrombospondin-1 protein. *Sci. Rep.* 5, 15018.
- Liu, C., Xie, L., and Zhang, R. (2016). Ca²⁺ mediates the self-assembly of the foot proteins of *Pinctada fucata* from the nanoscale to the microscale. *Biomacromolecules* 17, 3347–3355.
- Lucas, J.M., Vaccaro, E., and Waite, J.H. (2002). A molecular, morphometric and mechanical comparison of the structural elements of byssus from *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *J. Exp. Biol.* 205, 1807–1817.
- Makarev, E., Schubert, A.D., Kanherkar, R.R., London, N., Teka, M., Ozerov, I., Lezhnina, K., Bedi, A., Ravi, R., and Mehra, R. (2017). In silico analysis of pathways activation landscape in oral squamous cell carcinoma and oral leukoplakia. *Cell Death Discov.* 3, 17022.
- Martinez Rodriguez, N.R., Das, S., Kaufman, Y., Israelachvili, J.N., and Waite, J.H. (2015). Interfacial pH during mussel adhesive plaque formation. *Biofouling* 31, 221–227.

- Mazza, P.P.A., Martini, F., Sala, B., Magi, M., Colombini, M.P., Giachi, G., Landucci, F., Lemorini, C., Modugno, F., and Ribechini, E. (2006). A new Palaeolithic discovery: tar-hafted stone tools in a European Mid-Pleistocene bone-bearing bed. *J. Archaeol. Sci.* *33*, 1310–1318.
- McDonald, B.C., de Gouw, J.A., Gilman, J.B., Jathar, S.H., Akherati, A., Cappa, C.D., Jimenez, J.L., Lee-Taylor, J., Hayes, P.L., and McKeen, S.A. (2018). Volatile chemical products emerging as largest petrochemical source of urban organic emissions. *Science* *359*, 760–764.
- McDougall, C., and Degnan, B.M. (2018). The evolution of mollusc shells. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *7*, e313.
- Metzler, R.A., Rist, R., Alberts, E., Kenny, P., and Wilker, J.J. (2016). Composition and structure of oyster adhesive reveals heterogeneous materials properties in a biological composite. *Adv. Funct. Mater.* *26*, 6814–6821.
- Miao, Y., Zhang, L., Sun, Y., Jiao, W., Li, Y., Sun, J., Wang, Y., Wang, S., Bao, Z., and Liu, W. (2015). Integration of transcriptomic and proteomic approaches provides a core set of genes for understanding of scallop attachment. *Mar. Biotechnol.* *17*, 523–532.
- Michael, A.O.A., Ahsan, N., Zabala, V., Francois-Vaughan, H., Post, S., Brilliant, K.E., Salomon, A.R., Sanders, J.A., and Gruppuso, P.A. (2017). Proteomic analysis of laser capture microdissected focal lesions in a rat model of progenitor marker-positive hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* *8*, 26041.
- Mikami, M., Sonoki, T., Ito, M., Funasaka, Y., Suzuki, T., and Katagata, Y. (2013). Glycosylation of tyrosinase is a determinant of melanin production in cultured melanoma cells. *Mol. Med. Rep.* *8*, 818–822.
- Miller, M.R. (1973). A scanning electron microscope study of the papilla basilaris of *Gekko gecko*. *Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat.* *136*, 307–328.
- Miossec, L., Le Deuff, R.-M., and Gouletquer, P. (2009). Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). *ICES Coop. Res. Rep.* *299*.
- Mitchell, A., Guerra, D., Stewart, D., and Breton, S. (2016). *In silico* analyses of mitochondrial ORFans in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida) provide a framework for future studies of their origin and function. *BMC Genomics* *17*, 597.
- Miyamura, S., Sakaushi, S., Hori, T., and Nagumo, T. (2010). Behavior of flagella and flagellar root systems in the planozygotes and settled zygotes of the green alga *Bryopsis maxima* Okamura (Ulvophyceae, Chlorophyta) with reference to spatial arrangement of eyespot and cell fusion site: Planozygotes of *Bryopsis*. *Phycol. Res.* *58*, 258–269.
- Moeser, G.M., and Carrington, E. (2006). Seasonal variation in mussel byssal thread mechanics. *J. Exp. Biol.* *209*, 1996–2003.
- Moeser, G.M., Leba, H., and Carrington, E. (2006). Seasonal influence of wave action on thread production in *Mytilus edulis*. *J. Exp. Biol.* *209*, 881–890.
- Morisaki, T., Lyon, K., DeLuca, K.F., DeLuca, J.G., English, B.P., Zhang, Z., Lavis, L.D., Grimm, J.B., Viswanathan, S., and Looger, L.L. (2016). Real-time quantification of single RNA translation dynamics in living cells. *Science* *352*, 1425–1429.

-
- Naldrett, M.J., and Kaplan, D.L. (1997). Characterization of barnacle (*Balanus eburneus* and *B. crenatus*) adhesive proteins. *Mar. Biol.* *127*, 629–635.
- Nederbragt, A.J., van Loon, A.E., and Dictus, W.J.A.G. (2002). Expression of *Patella vulgata* orthologs of engrailed and dpp-BMP2/4 in adjacent domains during molluscan shell development suggests a conserved compartment boundary mechanism. *Dev. Biol.* *246*, 341–355.
- Nelson, T.C. (1924). The attachment of oyster larvae. *Biol. Bull.* *46*, 143–151.
- Normand, J., Ernande, B., Haure, J., McCombie, H., and Boudry, P. (2009). Reproductive effort and growth in *Crassostrea gigas*: comparison of young diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. *Aquat. Biol.* *7*, 229–241.
- North, M.A., Del Grosso, C.A., and Wilker, J.J. (2017). High strength underwater bonding with polymer mimics of mussel adhesive proteins. *ACS Appl. Mater. Interfaces* *9*, 7866–7872.
- Oberhauser, A.F., Marszalek, P.E., Erickson, H.P., and Fernandez, J.M. (1998). The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin. *Nature* *393*, 181.
- O'Donnell, M.J., George, M.N., and Carrington, E. (2013). Mussel byssus attachment weakened by ocean acidification. *Nat. Clim. Change* *3*, 587.
- Oliveira, L., Walker, D.C., and Bisalputra, T. (1980). Ultrastructural, cytochemical, and enzymatic studies on the adhesive “plaques” of the brown algae *Laminaria saccharina* and *Nereocystis luetkeana* (nert.). *Protoplasma* *104*, 1–15.
- Opell, B.D., Jain, D., Dhinojwala, A., and Blackledge, T.A. (2018). Tuning orb spider glycoprotein glue performance to habitat humidity. *J. Exp. Biol.* *221*, jeb161539.
- Ostasiewicz, P., and Wiśniewski, J. (2017). A protocol for large-scale proteomic analysis of microdissected formalin fixed and paraffin embedded tissue. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 159–176.
- Pacini, E., and Hesse, M. (2005). Pollenkitt—its composition, forms and functions. *Flora-Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* *200*, 399–415.
- Pan, Q., Qi, Q., Bao, L.-F., Qin, C.-L., He, J.-Y., Fan, M.-H., and Liao, Z. (2015). Illumina-based De novo sequencing and characterization of *Mytilus coruscus* foot transcriptome. *Chin. J. Biochem. Mol. Biol.* *8*, 014.
- Papadopoulos, J.S., and Agarwala, R. (2007). COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* *23*, 1073–1079.
- Park, K.H., Seong, K.-Y., Yang, S.Y., and Seo, S. (2017). Advances in medical adhesives inspired by aquatic organisms' adhesion. *Biomater. Res.* *21*, 16.
- Pasche, D., Horbelt, N., Marin, F., Motreuil, S., Macías-Sánchez, E., Falini, G., Hwang, D.S., Fratzi, P., and Harrington, M.J. (2018). A new twist on sea silk: The peculiar protein ultrastructure of fan shell and pearl oyster byssus. *Soft Matter*.
- Pastewka, L., and Robbins, M.O. (2014). Contact between rough surfaces and a criterion for macroscopic adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201320846.

- Patil, N., Jérôme, C., and Detrembleur, C. (2018). Recent advances in the synthesis of catechol-derived (bio) polymers for applications in energy storage and environment. *Prog. Polym. Sci.*
- Paz, M., Flückiger, R., Boak, A., Kagan, H., and Gallop, P.M. (1991). Specific detection of quinoproteins by redox-cycling staining. *J. Biol. Chem.* *266*, 689–692.
- Peng, Y.Y., Glattauer, V., Skewes, T.D., McDevitt, A., Elvin, C.M., Werkmeister, J.A., Graham, L.D., and Ramshaw, J.A. (2014). Identification of proteins associated with adhesive prints from *Holothuria dofleinii* Cuvierian tubules. *Mar. Biotechnol.* *16*, 695–706.
- Pennati, R., and Rothbacher, U. (2015). Bioadhesion in ascidians: a developmental and functional genomics perspective. *Interface Focus* *5*, 20140061.
- Peressadko, A., and Gorb, S.N. (2004). When less is more: experimental evidence for tenacity enhancement by division of contact area. *J. Adhes.* *80*, 247–261.
- Peters, W. (1972). Occurrence of chitin in Mollusca. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* *41*, 541–550.
- Petrone, L. (2013). Molecular surface chemistry in marine bioadhesion. *Adv. Colloid Interface Sci.* *195–196*, 1–18.
- Petrone, L., Ragg, N.L.C., and McQuillan, A.J. (2008). In situ infrared spectroscopic investigation of *Perna canaliculus* mussel larvae primary settlement. *Biofouling* *24*, 405–413.
- Petrone, L., Ragg, N.L.C., Girvan, L., and James McQuillan, A. (2009). Scanning electron microscopy and energy dispersive X-Ray microanalysis of *Perna canaliculus* mussel larvae adhesive secretion. *J. Adhes.* *85*, 78–96.
- Petton, B., Pernet, F., Robert, R., and Boudry, P. (2013). Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac. Environ. Interact.* *3*, 257–273.
- Piatigorsky, J., Kozmik, Z., Horwitz, J., Ding, L., Carosa, E., Robison, W.G., Steinbach, P.J., and Tamm, E.R. (2000). Ω -Crystallin of the Scallop Lens A dimeric aldehyde dehydrogenase class 1/2 Enzyme crystallin. *J. Biol. Chem.* *275*, 41064–41073.
- Pisanova, E., and Zhandarov, S. (2001). Reversible and irreversible adhesion of polymers: Possibilities for measurement and calculation. *J. Adhes.* *75*, 89–127.
- Pizzi, A., and Mittal, K.L. (2017). *Handbook of adhesive technology* (CRC press).
- Plastic Europe (2015). *Plastics—the Facts 2014/2015 An analysis of European plastics production, demand and waste data.* *Plast. Eur.*
- Priemel, T., Degtyar, E., Dean, M.N., and Harrington, M.J. (2017). Rapid self-assembly of complex biomolecular architectures during mussel byssus biofabrication. *Nat. Commun.* *8*, 14539.
- Prytherch, H.F. (1934). The role of copper in the setting, metamorphosis, and distribution of the American oyster, *Ostrea virginica*. *Ecol. Monogr.* *4*, 47–107.
- Qin, C., Pan, Q., Qi, Q., Fan, M., Sun, J., Li, N., and Liao, Z. (2016). In-depth proteomic analysis of the byssus from marine mussel *Mytilus coruscus*. *J. Proteomics* *144*, 87–98.

-
- Rich, A., and Crick, F. (1955). The structure of collagen.
- Riviere, G., Klopp, C., Ibouniyamine, N., Huvet, A., Boudry, P., and Favrel, P. (2015). GigaTON: an extensive publicly searchable database providing a new reference transcriptome in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *BMC Bioinformatics* *16*, 401.
- Robert, R., and Gérard, A. (1999). Bivalve hatchery technology: the current situation for the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and the scallop *Pecten maximus* in France. *Aquat. Living Resour.* *12*, 121–130.
- Rodrigues, M., Lengerer, B., Ostermann, T., and Ladurner, P. (2014). Molecular biology approaches in bioadhesion research. *Beilstein J. Nanotechnol.* *5*, 983.
- Rodrigues, M., Ostermann, T., Kremeser, L., Lindner, H., Beisel, C., Berezikov, E., Hobmayer, B., and Ladurner, P. (2016). Profiling of adhesive-related genes in the freshwater cnidarian *Hydra magnipapillata* by transcriptomics and proteomics. *Biofouling* *32*, 1115–1129.
- Roll, B., Vanboekel, M., Amons, R., and Dejong, W. (1995). pB-Crystallin, an aldose reductase-like lens protein in the Gecko *Lepidodactylus lugubris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *217*, 452–458.
- Rubio, C. (2002). Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention.
- Salvi, D., and Mariottini, P. (2016). Molecular taxonomy in 2D: a novel ITS2 rRNA sequence-structure approach guides the description of the oysters' subfamily Saccostreinae and the genus Magallana (Bivalvia: Ostreidae). *Zool. J. Linn. Soc.* *179*, 263–276.
- Santos, R., da Costa, G., Franco, C., Gomes-Alves, P., Flammang, P., and Coelho, A.V. (2009). First insights into the biochemistry of tube foot adhesive from the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinoidea, Echinodermata). *Mar. Biotechnol.* *11*, 686–698.
- Santos, R., Barreto, Â., Franco, C., and Coelho, A.V. (2013). Mapping sea urchins tube feet proteome — A unique hydraulic mechano-sensory adhesive organ. *J. Proteomics* *79*, 100–113.
- Schachner, M. (1997). Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 627–634.
- Schumacher, M.A., Rivard, A.F., Bächinger, H.P., and Adelman, J.P. (2001). Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin. *Nature* *410*, 1120.
- Schwartz, D., and Whistler, R.L. (2009). History and future of starch. In *Starch (Third Edition)*, (Elsevier), pp. 1–10.
- Sirmerova, M., Prochazkova, G., Siristova, L., Kolska, Z., and Branyik, T. (2013). Adhesion of *Chlorella vulgaris* to solid surfaces, as mediated by physicochemical interactions. *J. Appl. Phycol.* *25*, 1687–1695.
- Smith, A.M. (1991). Negative pressure generated by octopus suckers: a study of the tensile strength of water in nature. *J. Exp. Biol.* *157*, 257–271.
- Smith, A.M. (2002). The structure and function of adhesive gels from invertebrates. *Integr. Comp. Biol.* *42*, 1164–1171.
- Smith, A.M. (2006). The biochemistry and mechanics of gastropod adhesive gels. In *Biological Adhesives*, (Springer), pp. 167–182.

- Smith, A.M. (2010). Gastropod secretory glands and adhesive gels. In *Biological Adhesive Systems*, (Springer), pp. 41–51.
- Smith, A.M. (2016). *Biological Adhesives* (Springer International Publishing).
- Smith, A.M., and Callow, J.A. (2006). *Biological adhesives* (Springer).
- Smith, A.M., Papaleo, C., Reid, C.W., and Bliss, J.M. (2017). RNA-Seq reveals a central role for lectin, C1q and von Willebrand factor A domains in the defensive glue of a terrestrial slug. *Biofouling* 33, 741–754.
- So, C.R., Scancella, J.M., Fears, K.P., Essock-Burns, T., Haynes, S.E., Leary, D.H., Diana, Z., Wang, C., North, S., and Oh, C.S. (2017). Oxidase activity of the barnacle adhesive interface involves peroxide-dependent catechol oxidase and lysyl oxidase enzymes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9, 11493–11505.
- Spotorno-Oliveira, P., Figueiredo, M.A., and Tâmega, F.T. (2015). Coralline algae enhance the settlement of the vermetid gastropod *Dendropoma irregulare* (d'Orbigny, 1842) in the southwestern Atlantic. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 471, 137–145.
- Stark, A.Y., Palecek, A.M., Argenbright, C.W., Bernard, C., Brennan, A.B., Niewiarowski, P.H., and Dhinojwala, A. (2015). Gecko adhesion on wet and dry patterned substrates. *PLoS One* 10, e0145756.
- Steller, D.L., and Cáceres-Martínez, C. (2009). Coralline algal rhodoliths enhance larval settlement and early growth of the Pacific calico scallop *Argopecten ventricosus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 396, 49–60.
- Stewart, R.J., Weaver, J.C., Morse, D.E., and Waite, J.H. (2004). The tube cement of *Phragmatopoma californica*: a solid foam. *J. Exp. Biol.* 207, 4727–4734.
- Stewart, R.J., Wang, C.S., Song, I.T., and Jones, J.P. (2017). The role of coacervation and phase transitions in the sandcastle worm adhesive system. *Adv. Colloid Interface Sci.* 239, 88–96.
- Suci, P.A., and Geesey, G.G. (2001). Use of attenuated total internal reflection Fourier transform infrared spectroscopy to investigate interactions between *Mytilus edulis* foot proteins at a surface. *Langmuir* 17, 2538–2540.
- Suhre, M.H., and Scheibel, T. (2014). Structural diversity of a collagen-binding matrix protein from the byssus of blue mussels upon refolding. *J. Struct. Biol.* 186, 75–85.
- Suhre, M.H., Gertz, M., Steegborn, C., and Scheibel, T. (2014). Structural and functional features of a collagen-binding matrix protein from the mussel byssus. *Nat. Commun.* 5, 3392.
- Suppan, J., Engel, B., Marchetti-Deschmann, M., and Nürnberger, S. (2018). Tick attachment cement—reviewing the mysteries of a biological skin plug system. *Biol. Rev.* 93, 1056–1076.
- Suquet, M., de Kermoisan, G., Araya, R.G., Queau, I., Lebrun, L., Le Souchu, P., and Mingant, C. (2009). Anesthesia in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* 22, 29–34.
- Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251, 1451–1455.
- Tan, Y., Hoon, S., Guerette, P.A., Wei, W., Ghadban, A., Hao, C., Miserez, A., and Waite, J.H. (2015). Infiltration of chitin by protein coacervates defines the squid beak mechanical gradient. *Nat. Chem. Biol.* 11, 488.

-
- Tibabuzo Perdomo, A.M., Alberts, E.M., Taylor, S.D., Sherman, D.M., Huang, C.-P., and Wilker, J.J. (2018). Changes in cementation of reef building oysters transitioning from larvae to adults. *ACS Appl. Mater. Interfaces* *10*, 14248–14253.
- Valcourt, U., Alcaraz, L.B., Exposito, J.-Y., Lethias, C., and Bartholin, L. (2015). Tenascin-X: beyond the architectural function. *Cell Adhes. Migr.* *9*, 154–165.
- Vasquez, H.E., Hashimoto, K., Yoshida, A., Hara, K., Imai, C.C., Kitamura, H., and Satuito, C.G. (2013). A Glycoprotein in shells of conspecifics induces larval settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS ONE* *8*, e82358.
- Vogeler, S., Bean, T.P., Lyons, B.P., and Galloway, T.S. (2016). Dynamics of nuclear receptor gene expression during Pacific oyster development. *BMC Dev. Biol.* *16*, 33.
- Von Byern, J., and Grunwald, I. (2010). *Biological adhesive systems*. Vienna Springer Vienna.
- Von Der Haar, T. (2007). Optimized protein extraction for quantitative proteomics of yeasts. *PLoS One* *2*, e1078.
- Vreeland, V., Grotkopp, E., Espinosa, S., Quiroz, D., Laetsch, W., and West, J. (1993). The pattern of cell wall adhesive formation by *Fucus* zygotes. *Hydrobiologia* *260*, 485–491.
- Vreeland, V., Waite, J.H., and Epstein, L. (1998). Minireview—polyphenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels. *J. Phycol.* *34*, 1–8.
- Wagner, V.T., Brian, L., and Quatrano, R.S. (1992). Role of a vitronectin-like molecule in embryo adhesion of the brown alga *Fucus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *89*, 3644–3648.
- Waite, J.H. (1983). Evidence for a repeating 3, 4-dihydroxyphenylalanine-and hydroxyproline-containing decapeptide in the adhesive protein of the mussel, *Mytilus edulis* L. *J. Biol. Chem.* *258*, 2911–2915.
- Waite, J.H. (1987). Nature's underwater adhesive specialist. *Int. J. Adhes. Adhes.* *7*, 9–14.
- Waite, J.H. (2017). Mussel adhesion—essential footwork. *J. Exp. Biol.* *220*, 517–530.
- Waite, J.H., and Qin, X. (2001). Polyphosphoprotein from the adhesive pads of *Mytilus edulis* †. *Biochemistry (Mosc.)* *40*, 2887–2893.
- Waite, J.H., and Tanzer, M.L. (1980). The bioadhesive of *Mytilus* byssus: a protein containing L-dopa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *96*, 1554–1561.
- Waite, J.H., Hansen, D.C., and Little, K.T. (1989). The glue protein of ribbed mussels (*Geukensia demissa*): a natural adhesive with some features of collagen. *J. Comp. Physiol. B* *159*, 517–525.
- Waite, J.H., Jensen, R.A., and Morse, D.E. (1992). Cement precursor proteins of the reef-building polychaete *Phragmatopoma californica* (Fewkes). *Biochemistry (Mosc.)* *31*, 5733–5738.
- Waite, J.H., Andersen, N.H., Jewhurst, S., and Sun, C. (2005). Mussel adhesion: finding the tricks worth mimicking. *J. Adhes.* *81*, 297–317.
- Walker, G. (1971). A study of the cement apparatus of the cypris larva of the barnacle *Balanus balanoides*. *Mar. Biol.* *9*, 205–212.

- Walkera, G., and Youngson, A. (1975). The biochemical composition of *Lepas anatifera* (L.) cement (Crustacea: Cirripedia). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* *55*, 703–707.
- Waller, T.R. (1981). Functional morphology and development of veliger larvae of the European oyster, *Ostrea edulis* Linné.
- Wan, K., Smith, D.T., and Lawn, B.R. (1992). Fracture and contact adhesion energies of Mica-Mica, Silica-Silica, and Mica-Silica interfaces in dry and moist atmospheres. *J. Am. Ceram. Soc.* *75*, 667–676.
- Wang, C.S., and Stewart, R.J. (2013). Multipart copolyelectrolyte adhesive of the sandcastle worm, *Phragmatopoma californica* (Fewkes): catechol oxidase catalyzed curing through peptidyl-DOPA. *Biomacromolecules* *14*, 1607–1617.
- Wang, C.-S., Pan, H., Weerasekare, G.M., and Stewart, R.J. (2015a). Peroxidase-catalysed interfacial adhesion of aquatic caddisworm silk. *J. R. Soc. Interface* *12*, 20150710.
- Wang, J., Wu, C., Xu, C., Yu, W., Li, Z., Li, Y., Guo, T., and Wang, X. (2015b). Voltage-gated potassium ion channel may play a major role in the settlement of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Aquaculture* *442*, 48–50.
- Wang, L., Clarke, L.A., Eason, R.J., Parker, C.C., Qi, B., Scott, R.J., and Doughty, J. (2017a). PCP-B class pollen coat proteins are key regulators of the hydration checkpoint in *Arabidopsis thaliana* pollen–stigma interactions. *New Phytol.* *213*, 764–777.
- Wang, X., Wang, M., Jia, Z., Qiu, L., Wang, L., Zhang, A., and Song, L. (2017b). A carbonic anhydrase serves as an important acid-base regulator in pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to elevated CO₂: implication for physiological responses of mollusk to ocean acidification. *Mar. Biotechnol.* *19*, 22–35.
- Wang, Y., Yang, X., Chen, Y., Wainwright, D.K., Kenaley, C.P., Gong, Z., Liu, Z., Liu, H., Guan, J., and Wang, T. (2017c). A biorobotic adhesive disc for underwater hitchhiking inspired by the remora suckerfish. *Sci Robot* *2*, 8072eaan.
- Wanninger, A. (2015). Evolutionary developmental biology of invertebrates 2: Lophotrochozoa (Spiralia) (Springer).
- Wetherbee, R., Lind, J.L., Burke, J., and Quatrano, R.S. (1998). Minireview—The first kiss: establishment and control of initial adhesion by raphid diatoms. *J. Phycol.* *34*, 9–15.
- Whittaker, C.A., and Hynes, R.O. (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol. Biol. Cell* *13*, 3369–3387.
- Wiegemann, M. (2005). Adhesion in blue mussels (*Mytilus edulis*) and barnacles (genus *Balanus*): mechanisms and technical applications. *Aquat. Sci.-Res. Boundaries* *67*, 166–176.
- Wilker, J.J. (2011). Redox and adhesion on the rocks. *Nat. Chem. Biol.* *7*, 579.
- Wilker, J.J. (2017). How to suck like an octopus. *Nature* *546*, 358.
- Williamson, M.P. (1994). The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* *297*, 249.

-
- Willis, A., Eason-Hubbard, M., Hodson, O., Maheswari, U., Bowler, C., and Wetherbee, R. (2014). Adhesion molecules from the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae): genomic identification by amino-acid profiling and in vivo analysis. *J. Phycol.* *50*, 837–849.
- Wolff, J.O., Grawe, I., Wirth, M., Karstedt, A., and Gorb, S.N. (2015). Spider's super-glue: thread anchors are composite adhesives with synergistic hierarchical organization. *Soft Matter* *11*, 2394–2403.
- Wu, C., Jiang, Q., Wei, L., Cai, Z., Chen, J., Yu, W., He, C., Wang, J., Guo, W., and Wang, X. (2018). A Rhodopsin-Like gene may be associated with the light-sensitivity of adult Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Front. Physiol.* *9*, 221.
- Wustman, B.A., Gretz, M.R., and Hoagland, K.D. (1997). Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae) (I. A model of adhesives based on chemical characterization and localization of polysaccharides from the marine diatom *Achnanthes longipes* and other diatoms). *Plant Physiol.* *113*, 1059–1069.
- Xin, J., Zhang, P., Huang, K., and Zhang, J. (2014). Study of green epoxy resins derived from renewable cinnamic acid and dipentene: synthesis, curing and properties. *RSC Adv.* *4*, 8525–8532.
- Yamaguchi, K. (1994). Shell structure and behaviour related to cementation in oysters. *Mar. Biol.* *118*, 89–100.
- Yap, F.C., Wong, W.-L., Maule, A.G., Brennan, G.P., Chong, V.C., and Lim, L.H.S. (2017). First evidence for temporary and permanent adhesive systems in the stalked barnacle cyprid, *Octolasmis angulata*. *Sci. Rep.* *7*, 44980.
- Yoo, H.Y., Iordachescu, M., Huang, J., Hennebert, E., Kim, S., Rho, S., Foo, M., Flammang, P., Zeng, H., and Hwang, D. (2016a). Sugary interfaces mitigate contact damage where stiff meets soft. *Nat. Commun.* *7*, 11923.
- Yoo, H.Y., Huang, J., Li, L., Foo, M., Zeng, H., and Hwang, D.S. (2016b). Nanomechanical contribution of collagen and von Willebrand factor A in marine underwater adhesion and its implication for Collagen Manipulation. *Biomacromolecules* *17*, 946–953.
- Young, T., Alfaro, A.C., Sánchez-Lazo, C., and Robertson, J. (2015). Putative involvement of adrenergic receptors in regulation of mussel (*Perna canaliculus*) larval settlement. *Mar. Biol. Res.* *11*, 655–665.
- Yurchenko, O.V., Skiteva, O.I., Voronezhskaya, E.E., and Dyachuk, V.A. (2018). Nervous system development in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia). *Front. Zool.* *15*, 10.
- Zhang, C., and Zhang, R. (2006). Matrix proteins in the outer shells of molluscs. *Mar. Biotechnol.* *8*, 572–586.
- Zhang, G., Fang, X., Guo, X., Li, L., Luo, R., Xu, F., Yang, P., Zhang, L., Wang, X., Qi, H., *et al.* (2012). The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* *490*, 49–54.
- Zhang, G., He, L., Wong, Y.-H., Xu, Y., Zhang, Y., and Qian, P. (2015). Chemical component and proteomic study of the *Amphibalanus* (= *Balanus*) amphitrite shell. *PloS One* *10*, e0133866.
- Zhang, X., Dai, X., Wang, L., Miao, Y., Xu, P., Liang, P., Dong, B., Bao, Z., Wang, S., and Lyu, Q. (2018). Characterization of an atypical metalloproteinase inhibitors like protein (Sbp8-1) from scallop byssus. *Front. Physiol.* *9*.

Zhao, H., and Waite, J.H. (2005). Coating proteins: structure and cross-linking in fp-1 from the green shell mussel *Perna canaliculus*. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 15915–15923.

Zhao, H., and Waite, J.H. (2006). Linking adhesive and structural proteins in the attachment plaque of *Mytilus californianus*. *J. Biol. Chem.* 281, 26150–26158.

Zhao, H., Sun, C., Stewart, R.J., and Waite, J.H. (2005). Cement proteins of the tube-building polychaete *Phragmatopoma californica*. *J. Biol. Chem.* 280, 42938–42944.

Zhao, H., Nam, P.K., Richards, V.L., and Lekakh, S.N. (2018). Thermal decomposition studies of EPS foam, polyurethane foam, and epoxy resin (SLA) as patterns for investment casting; Analysis of Hydrogen Cyanide (HCN) from thermal degradation of polyurethane foam. *Int. J. Met.* 1–8.

Zhao, X., Yu, H., Kong, L., and Li, Q. (2012). Transcriptomic responses to salinity stress in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One* 7, e46244.

Sites internet consultés :

www.astm.org

www.coatingsworld.com


www.fao.org

www.larousse.fr

www.inrs.fr

echa.europa.eu

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Proteinaceous secretion of bioadhesive produced during crawling and settlement of *Crassostrea gigas* larvae

Valentin Foulon¹, Sébastien Artigaud¹, Manon Buscaglia¹, Benoit Bernay², Caroline Fabioux¹, Bruno Petton³, Philippe Elies⁴, Kada Boukerma⁵, Claire Hellio¹, Fabienne Guérard¹ & Pierre Boudry³

Bioadhesion of marine organisms has been intensively studied over the last decade because of their ability to attach in various wet environmental conditions and the potential this offers for biotechnology applications. Many marine mollusc species are characterized by a two-phase life history: pelagic larvae settle prior to metamorphosis to a benthic stage. The oyster *Crassostrea gigas* has been extensively studied for its economic and ecological importance. However, the bioadhesive produced by ready to settle larvae of this species has been little studied. The pediveliger stage of oysters is characterized by the genesis of a specific organ essential for adhesion, the foot. Our scanning electron microscopy and histology analysis revealed that in *C. gigas* the adhesive is produced by several foot glands. This adhesive is composed of numerous fibres of differing structure, suggesting differences in chemical composition and function. Fourier transformed infrared spectroscopy indicated a mainly proteinaceous composition. Proteomic analysis of footprints was able to identify 42 proteins, among which, one uncharacterized protein was selected on the basis of its pediveliger transcriptome specificity and then located by mRNA *in situ* hybridization, revealing its potential role during substrate exploration before oyster larva settlement.

In aquatic ecosystems, adhesion of organisms is a complex phenomenon due to the high diversity of substrates and variability of environments. Biofouling, which can be defined as the adhesion and subsequent growth of organisms on a substrate has been extensively described in marine environments¹. It can be observed at every depth, from the surface to the bottom of the ocean, on floating or fixed substrates, which may be organic or inorganic, biotic (alive or dead) or abiotic, soft or hard. Settlement on a substrate is a strategy used by aquatic organisms to ensure survival, feeding, a high rate of reproduction, and sometimes metamorphosis; some species show gregarious traits and can induce settlement of conspecifics by chemical signalling^{2,3}. Thus, in order to adhere to a substrate, organisms can use mechanical and/or chemical strategies. The latter imply the synthesis and use of bioadhesive polymers, which are usually mostly composed of a mix of proteins and polysaccharides^{4,5}. However, inorganic components can sometimes predominate, e.g. representing 86% of adhesive from reef building oysters^{6,7}. Lipids can also be produced, as observed in barnacle larvae, and play a role in the conditioning of the substrate prior to adhesive secretion⁸. Mechanical and chemical strategies can generate reversible or irreversible adhesion. Irreversible adhesion occurs in many benthic organisms that are firmly stuck to substrates, such as macroalgae⁹ or some bivalves like mussels¹⁰ or oysters¹¹.

In recent decades, increasing research has been dedicated to marine bioadhesives¹². One of the main characteristics of marine bioadhesives is their ability to polymerize very quickly in water (within a few minutes),

¹Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin (LEMAR), UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Institut Universitaire Européen de la Mer, Technopole Brest-Iroise, Rue Dumont d'Urville, 29280, Plouzané, France.

²Plateforme Proteogen SF ICORE, Université de Caen Basse-Normandie, 14032, Caen Cedex, France. ³Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Centre Bretagne, 29280, Plouzané, France. ⁴Plateforme d'Imagerie et de Mesures en Microscopie, Université de Bretagne Occidentale, 29200, Brest, France. ⁵Ifremer, Laboratoire Détection, Capteurs et Mesures (LDCM), Centre Bretagne, 29280, Plouzané, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.F. (email: valentin.foulon@univ-brest.fr)

and with a large scale of strengths¹³. Biomimetic formulations inspired by marine bioadhesives could offer a higher strength than the best synthetic glue actually on the market¹⁴. Moreover, most synthetic adhesives are formulated with toxic solvents, while the formulation of biomimetic bioadhesives can be achieved without solvents and can therefore be biocompatible, allowing biomedical applications¹⁵. Mussel byssus is the best known marine bioadhesive, having been studied for over forty years¹⁶. Byssus, specifically produced by the foot of the mussel, is composed of a variety of mussel foot proteins showing post-translational hydroxylation of tyrosine with 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) motifs^{16,17}. Intensive research efforts on the characterization of byssus protein resulted in biotechnological applications of these proteins^{14,18,19}. However, many other marine organisms that strongly adhere to their substrate by bioadhesives remain to be investigated. Most bivalves secrete adhesive during the settlement stage of their life cycle, which marks the transition between pelagic larval stage and benthic adult stage by metamorphosis²⁰. Oysters, which are permanently fixed on their substrate at the adult stage, settle definitively at the larval stage prior to metamorphosis. Living in the intertidal zone, Pacific oysters *Crassostrea gigas* are exposed to harsh conditions and could potentially produce bioadhesives with outstanding properties. *C. gigas* is among the most studied marine organisms because of its economic and environmental importance. Its life cycle has been extensively described and artificial reproduction is fully mastered, allowing mass hatchery production of juveniles. *C. gigas* larval development commonly lasts about 15 days at 25 °C, depending on temperature and food availability.

At this stage, pediveliger larvae, with shell lengths of 280 to 300 µm, are characterized by the presence of a foot: an organ specific to the settlement phase in oysters. When larvae stop swimming and sink, the foot explores the substrate by crawling for a few minutes. Finally, at the end of the crawling phase, the foot secretes the final adhesive for definitive attachment. Metamorphosis of *C. gigas* larvae occurs a few hours later and the foot is totally resorbed after this stage¹⁴. In other bivalve species that are not definitively fixed to their substrate, the foot is not resorbed during metamorphosis and can develop to become a highly specific organ, like in mussels.

One of the main challenges of studying adhesives from larvae is to obtain sufficient material for further analysis. Indeed, previous research estimated the volume of oyster adhesive secretion at a few hundred picolitres²¹. Since this first investigation on European flat oyster *O. edulis*²², 45 years ago, only a few papers have been published on oyster larval settlement and their adhesive composition. This knowledge would be useful for the optimization of larval settlement under natural or hatchery conditions of this important aquaculture organism and might lead to the development of novel biomimetic bioadhesives.

In our research project, we investigated the adhesion process and adhesive composition of *C. gigas* larvae. Foot structure was described using histology and scanning electron microscopy (SEM) techniques. The adhesive was first examined through microscopy observations, spectrometry and proteomic analysis. Our proteomic analysis of *C. gigas* larvae was based on genome and transcriptome data from Zhang *et al.*²³. For each detected protein, corresponding gene expression level was analysed for each developmental stage using transcriptomic databases²³. One candidate gene, selected based on its specific expression profile at pediveliger stage, has been deeply studied by *in situ* hybridization.

Results

Foot anatomy and adhesive structure. Figure 1 depicts a settled *C. gigas* pediveliger larva observed by scanning electron microscopy (SEM) and indicates the anatomical planes of sections used in histology (see below). The foot, approximately 140 µm long and 40 µm wide, is located in the posterior part of the larva (Fig. 2). SEM observations show the longitudinal symmetry of the foot (Fig. 2A–C). Cilia are present all around the foot from the tip to the heel, but are absent at the base of the foot, behind the heel (Fig. 2B,C). The byssus duct was observed at the anterior face of the foot in front of the heel (Fig. 2C). The tip of the foot of crawling pediveliger larvae has a zone where cilia are stuck together (Fig. 2D,E). On the tip of the foot, at the base of the cilia, numerous vesicles of 50 to 150 nm can be observed on the surface of the epidermis (Fig. 2F).

An anatomical description of pediveliger larvae (Fig. 3A–C) and more specifically of the foot (Fig. 3D–G) was made from histological sections. The three anatomical section planes indicated in Fig. 1 are presented in Fig. 3: a transverse section (Fig. 3A) making it possible to observe the longitudinal bilateral symmetry, a frontal section (Fig. 3B), and a sagittal section (Fig. 3C). The mantle (m), observed on both section planes, produces the periostracum (p) from the periostracal groove. The periostracum is a protective and structural organic part of the shell, remaining after decalcification. The velum (v), shown deployed in Figs 2B,D and 3A and retracted in Fig. 3C is a ciliated organ used by larvae to swim and to collect food particles. The food particles are then ingested by the mouth (mo), a ciliated orifice connected to the visceral cavity (vc) by the oesophagus (o) (Fig. 3C). Adductor muscles (posterior and anterior) located on both sides of the visceral cavity (Fig. 3C) link the two shell valves (Fig. 3A). The foot is surrounded by rudimentary gills (Fig. 3A) and is linked at the base to the posterior adductor muscle (Fig. 3B,C).

Serial transversal sections of the foot were performed from the anterior (heel) to the posterior (tip) (Fig. 3D–G). The main structures of the foot observed on the slides are: a ciliated epithelium that can be observed on the external part of the foot (Fig. 3C,E,G); circular nerve structures corresponding to pedal ganglia (pg) of approximately 20 µm in diameter, located on the anterior part of the foot (Fig. 3E,F); muscular fibres observed around the pedal ganglia and progressing along the foot (Fig. 3D,E); conjunctive-like tissue; and the principal foot adhesive gland (fg) (Fig. 3A–E). This gland contains strongly eosinophilic granules (in pink), indicating a proteinaceous composition, and is located at the base of the foot (Fig. 3B). In Fig. 3H, the positive reaction to picric acid in yellow of this granules confirmed the protein content. Massive secreting cells, stained in purple, are located at the base of this gland between the foot and the visceral cavity (Fig. 3B – arrow). This main gland is divided into two parts (Fig. 3D), which lead to the byssus duct (Fig. 3E). Live light microscopy observations of cementing larvae indicate the central role of this gland during adhesion, releasing the majority of the final adhesive (see Supplementary Video 1). Immediately after secretion, adhesive was observed to have polymerized and settled larvae by their left

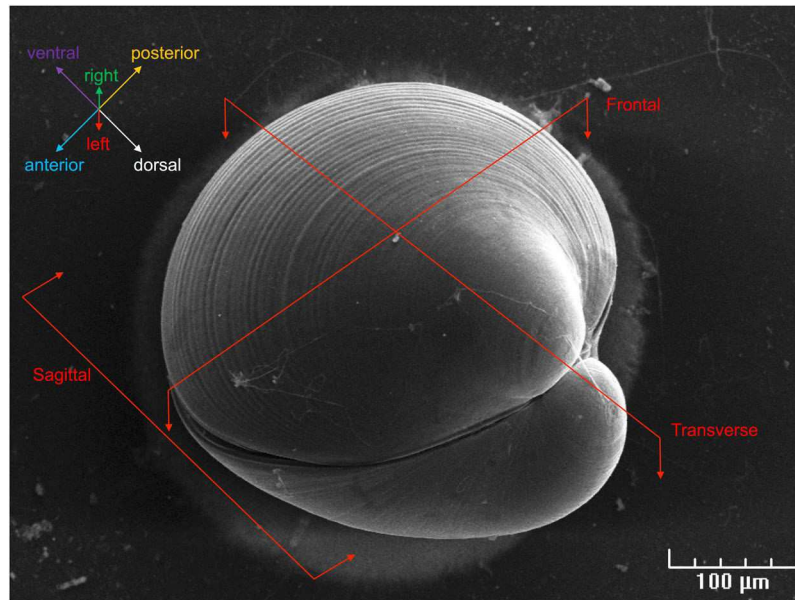


Figure 1. Scanning electron microscopy observation of a settled *Crassostrea gigas* pediveliger larva. Three dimensional animal orientation and planes of sections are indicated.

valve. In the Fig. 3H, five other groups of cells stained differently by the multichrome technic were described. By comparisons, nomenclature used in *O. edulis* was used:

- (i) a row of turquoise blue cells distributed in the epithelium of the underside of the foot were positive to alcian blue staining indicating a high acid polysaccharides content (Gland A).
- (ii) cells with purple staining (neutral polysaccharides), browse through the length of the foot, from the pedal ganglion to the tip, where they appeared to lead to a row of 3 to 4 cells (Gland B).
- (iii) the byssus duct of *C. gigas* pediveliger larvae is surrounded by three cell types, called glands D. Massive cells, rich in acidic polysaccharides, were observed attached to the main gland of adhesive. These cells, about 20 μm by 5 μm in size, appeared to lead directly into the byssus duct. Other cells with the same morphology, but stained in purple with a dark blue perimeter were observed on either side of the byssus duct. Finally, small dark blue cells (1 to 2 μm in diameter) were observed on the lower part of the byssus duct, near the heel of the foot.

SEM observations clearly revealed that the adhesive forms a perfect seal between the left shell of the larva and the substrate (Fig. 4A). SEM analyses also highlighted the fibrous structure of *C. gigas* adhesive (Fig. 4B–D). Two main zones could be differentiated in the adhesive, with variations in fibrous structure: the outer zone (oz), composed of tight filaments like a protective collar, and the inner zone (iz), composed of slacker vertically ordered fibres (Fig. 4B,C). In the outer zone, near the shell, fibres coalesce into larger ones and form a packed structure (Fig. 4D). Bacteria were present in the adhesive and around settled larvae (Fig. 4D,F). After removing larvae from the substrate with micro-forceps, a part of the adhesive remained present with shell debris (Fig. 4E). Around settled larvae, filaments were observed with a diameter of 1 to 2 μm. Higher magnification of these filaments revealed nanostructures which stuck them to the substrate (Fig. 4E,G).

Adhesive composition. Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDS) revealed the elemental composition of the adhesive footprint. In Fig. 5A, an EDS spectrum of upside-down larvae with adhesive that had the same orientation to the EDS detector presents carbon, oxygen, iron, copper, sodium, magnesium, aluminium, silicon, phosphorus, sulfur, chloride, potassium and calcium peaks. Iron, copper, magnesium, aluminium and phosphorus were not precisely located with spatial mapping analysis, probably because of their low abundance in the sample. Silicon was detected in small dots in the adhesive, potentially resulting from debris of diatom frustules. Sodium, chloride and potassium are co-located in aggregates in the adhesive (Fig. 5C–E). EDS spatial mapping located nitrogen in the adhesive, not annotated in the spectra because of its detection between the carbon and oxygen peaks. Sulfur is also specifically present in the adhesive disc (Fig. 5B).

The FTIR analysis did not show differences between the inner (in red) and outer (in blue) zones of the adhesive footprint (Fig. 6). Peak intensity difference in spectra was explained by the difference in adhesive thickness between outer and inner zones. A clear protein signal was obtained from the adhesive footprint of *C. gigas* with dominant amide I and II bands near 1,650 and 1,550 cm^{-1} . The peak at 3,290 cm^{-1} corresponds to the amide N-H stretch and/or C=O bounds. Phosphorylated proteins could be present between 900 and 1,200 cm^{-1} . Polysaccharides can also be seen at 1,000–1,150 cm^{-1} . Potential sulfated polysaccharides are present with a band in the region between 1,240 and 1,245 cm^{-1} . The band observed at 2,925 cm^{-1} can be assigned to C-H stretching.

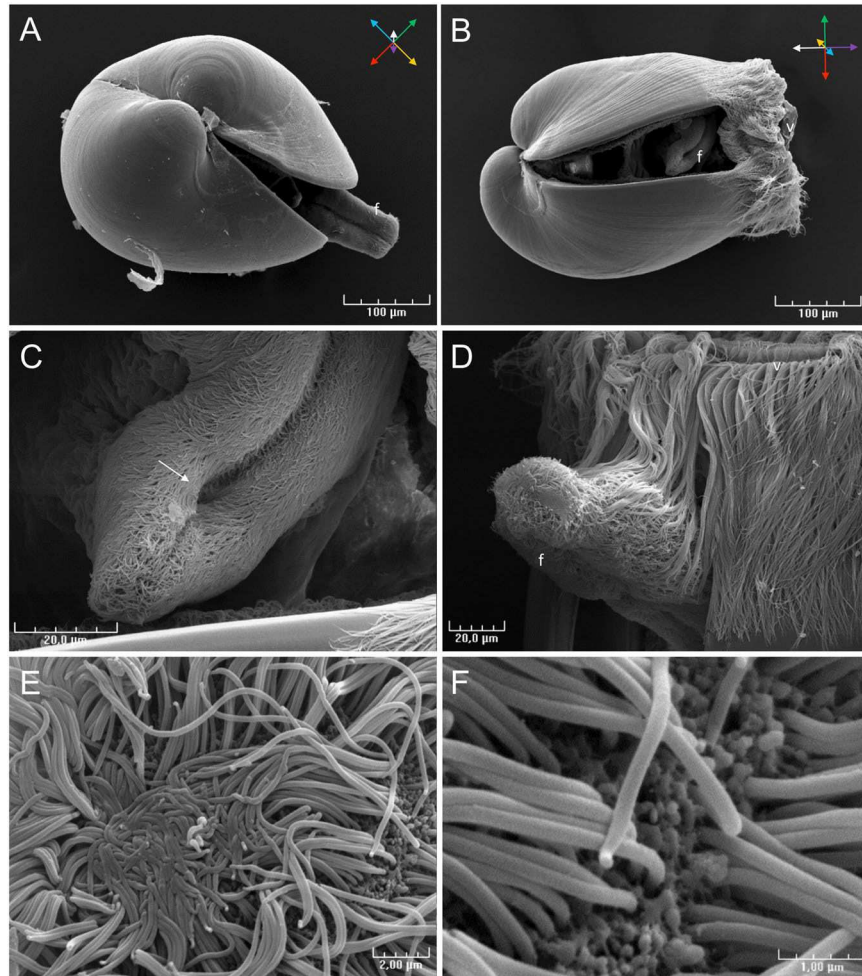


Figure 2. Scanning electron microscopy observation of a *Crassostrea gigas* pediveliger larva. (A) Dorsal view, the foot is extended out from the larva. (B) Posterior view, the foot is retracted behind the velum. (C) The byssus duct (arrow) is located next to the heel of the foot. (D,E) Observation of the tip of the foot of a crawling larva showing a flattened cilia zone. (F) Vesicles observed on the epithelium surface of the tip of the foot, at the base of cilia. f: foot, v: velum.

Five protein extraction protocols were tested on adhesive foot print (see Supplementary Note) based on chaotropic agent (urea, or guanidine hydrochloride acid, or NaOH), and/or chelating agent (EDTA). No adhesive fibres solubilisation was observed in microscopy observation and protein assay after these treatments.

Enzymatic digestion of the adhesive footprint from *C. gigas* was analysed by Nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nanoLC MS/MS). Forty-two proteins were identified in all three replicate samples (see Supplementary Table 1). All proteins detected in each replicate are listed in Supplementary Table 2 and were successfully assigned to an oyster genomic sequence. Molecular function annotation showed that 82% of the 42 proteins mutually identified had a binding domain, 43% were annotated for catalytic activity and 20% had structural molecular activity. Expression profiles of the genes encoding these proteins were analysed based on the transcriptomic data from Zhang *et al.* (2012) (see Supplementary Table 1). All the genes corresponding to the detected proteins are expressed at the pediveliger stage. Interestingly, one gene, the “PREDICTED Uncharacterized protein LOC105327706”, is specifically strongly expressed at the pediveliger stage. This predicted protein was detected by one (7.14% coverage) or two peptides (9.14% coverage) in the three replicates using nanoLC MS/MS analysis, with a MASCOT score of 102.01 ± 6.38 (see Supplementary Table 2, protein sequence in Supplementary Note). This gene was selected for deeper gene expression location by mRNA *in situ* hybridization (ISH).

mRNA location of “PREDICTED: Uncharacterized protein LOC105327706”. The tissue expression pattern of the “PREDICTED: uncharacterized protein LOC105327706” (CGI_10007887) gene was successfully located by whole ISH (WISH) in pediveliger larvae and by ISH in adult specimens of *C. gigas*. According to the tissue expression pattern, we named this gene *Cg_fmp* for *Crassostrea gigas* foot mantle protein. No coloration was observed in the negative control, indicating the specificity of ISH and WISH staining (Fig. 7A). At the pediveliger stage, the *Cg_fmp* mRNA are specifically located in the mantle margin and in the tip of the foot (Fig. 7B–D). In the mantle margin of larvae, only a few rows of epithelial cells are stained (Fig. 7B–D). The tip of the foot

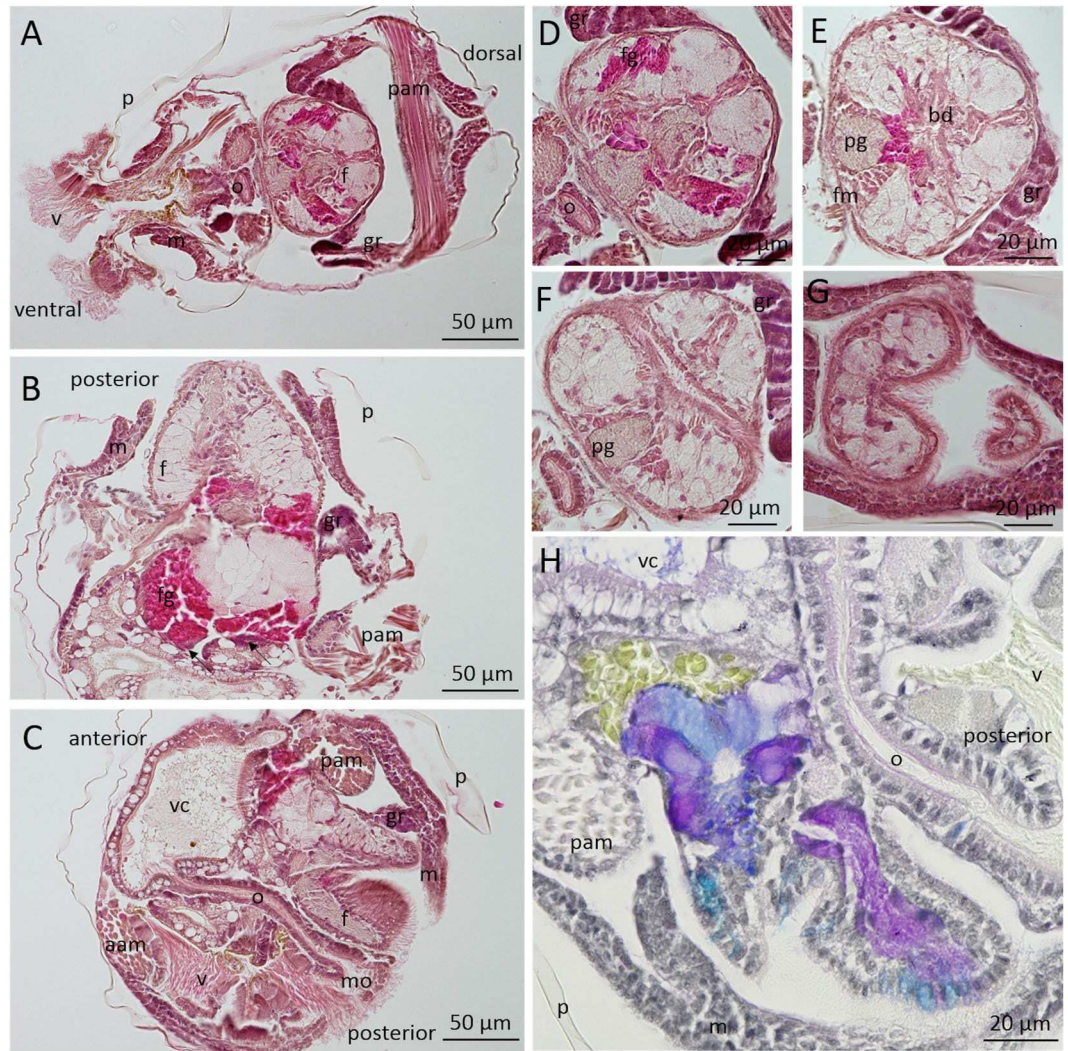


Figure 3. Histological observation of *Crassostrea gigas* pediveliger larvae stained with hematoxylin and eosin (A–G) and multichrome technique (Alcian Blue, Periodic Acid–Schiff’s, Haematoxylin, Picric Acid) (H). A: Transverse, B: Frontal, C and H: Sagittal sections of the whole larvae. (D–G) show serial transverse sections of a foot. aam: anterior adductor muscle, bd: byssus duct, f: foot, fg: foot gland, fm: foot muscle, gr: gill rudiment, m: mantle, mo: mouth, o: oesophagus, p: periostracum, pam: posterior adductor muscle, pg: pedal ganglia, v: velum, vc: visceral cavity, arrow: secreting cells from the foot gland.

appears strongly stained (Fig. 7B–D), as for the mantle, with staining affecting 3 or 4 rows of epithelial cells with a decreasing intensity of staining from the external to the internal zone of the foot. In adults, *Cg_fmp* mRNA are only located in the three folds of the mantle margin (Fig. 7E), more precisely in the cylindrical cells of the external and inner fold (Fig. 7F,G) and in the cubic cells of the median fold (Fig. 7H).

Discussion

The aim of our study was to make the first exploration of the adhesive of pediveliger *Crassostrea gigas* larvae. Fifty years ago, a first precise description of adhesion and foot structure in the *Ostreidae* was published by H.J. Cranfield for *Ostrea edulis*^{24,25}. These founding results¹¹ were extended by further histological descriptions of pediveliger larvae in the American oyster *Crassostrea virginica*^{26,27}. More recently, the molecular character of several marine biological adhesives has been totally or partially decrypted driven by the biotechnological potential of these molecules¹². Despite these efforts, no marine larval adhesives have been fully characterised, partly due to the difficulty in obtaining enough biological material to this. Concerning *C. gigas* larvae, no information was yet available concerning structural, chemical and molecular composition of the adhesive despite the economic and ecological importance of this species.

Our observations of *C. gigas* larval settlement behaviour led to similar conclusions to those reported by Cranfield in *O. edulis*²⁴. Before cementing, *C. gigas* pediveliger larvae stop swimming, sink, and explore the substrate for a few minutes by sequences of foot contractions. In *O. edulis*, glands presenting a polysaccharide or glycoprotein content, also detected in *C. gigas* by multichrome staining (A, B and D), had a role during the

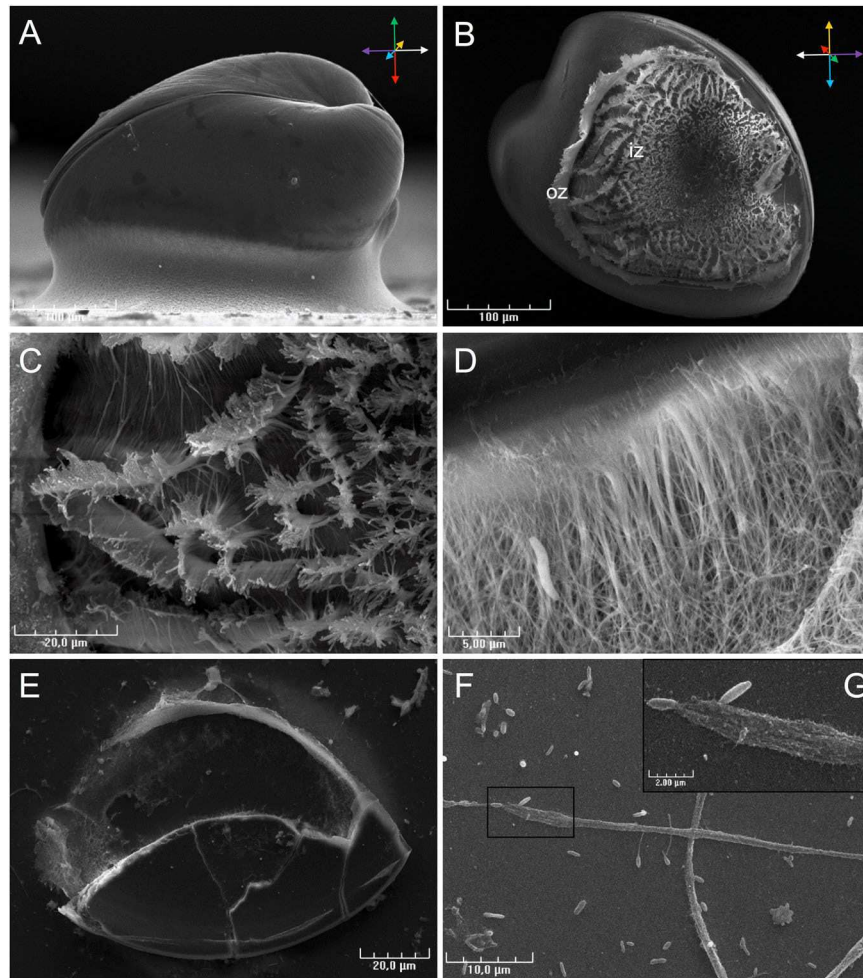


Figure 4. Scanning electron microscopy (SEM) observations of settled *Crassostrea gigas* pediveliger larvae. (A) Lateral view of a settled larva showing adhesive sealant between the left shell and the substrate. (B) The larva was removed from the substrate to visualize the adhesive structure. Two types of fibre are observed, composing the outer zone (oz) and inner zone (in). (C) In the inner zone, fibre shape is typical of the substrate roughness. (D) Fibres of the outer zone in contact with the shell (at the top) are larger and converge in a homogenous substance at the edge of the mantle. Bacteria were observed stuck in the fibres of the outer zone. (E) Adhesive footprint. (F) Byssus filament was observed around settled larvae. (G) High magnification indicates the presence of microfibrils that stuck the byssus filament to the substrate.

crawling phase^{21,25}. Larvae sampled during this crawling phase present cilia overwriting at the extremity of their foot resulting from foot pressing during locomotion. Vesicles observed at the base of the cilia at the tip of the foot probably from gland B, secrete an adhesive substance which subsequently allows the larvae to stick to their substrate during crawling²⁵. At the end of the crawling phase, i.e. just before adhesive secretion, larvae begin anchorage to the substrate, weaving filaments between the foot and the substrate. The origin of the secretion of this filament was not precisely determined, but similar observations in *O. edulis* led to the hypothesis that byssus filaments are secreted to the byssus duct by group of glands D²⁵. Finally, the foot secretes most of the adhesive by contraction of the principal gland, named “C1” in *O. edulis* or “byssal gland” in *C. virginica*^{22,27}. As seen in the present study, this gland is composed of strongly eosinophilic granules and positive picric acid staining observed in histological sections, indicating a proteinaceous composition. After secretion of gland C, adhesive of *C. gigas* presents a fibrous structure, similar to that observed in *O. edulis*²¹ and in *C. virginica*²⁸. Our SEM observations revealed an outer and an inner zone with different fibrous structures, suggesting potential differences in composition and complementary roles in their adhesive properties. However, no spectral differences were observed between the two adhesive zones by Fourier Transform InfraRed analysis. Our FTIR investigation made on the *C. gigas* adhesive footprint showed major protein and carbohydrate signals, similarly to the first investigations performed in *O. edulis* by Cranfield in the 70s with histochemical techniques. The Infrared spectrum of *C. gigas* adhesive is also similar to that of mussel larva adhesive^{29,30}. FTIR indicated the molecules and functional group constituting the adhesive, and the presence of proteins could be expected. Indeed, proteins play an essential role in most marine adhesives characterised¹², particularly in molluscs^{5,31}. For example in mussels, proteins with DOPA motifs are directly and essentially implicated in adhesion to other proteins and to the substrate^{16,32}. Elemental composition

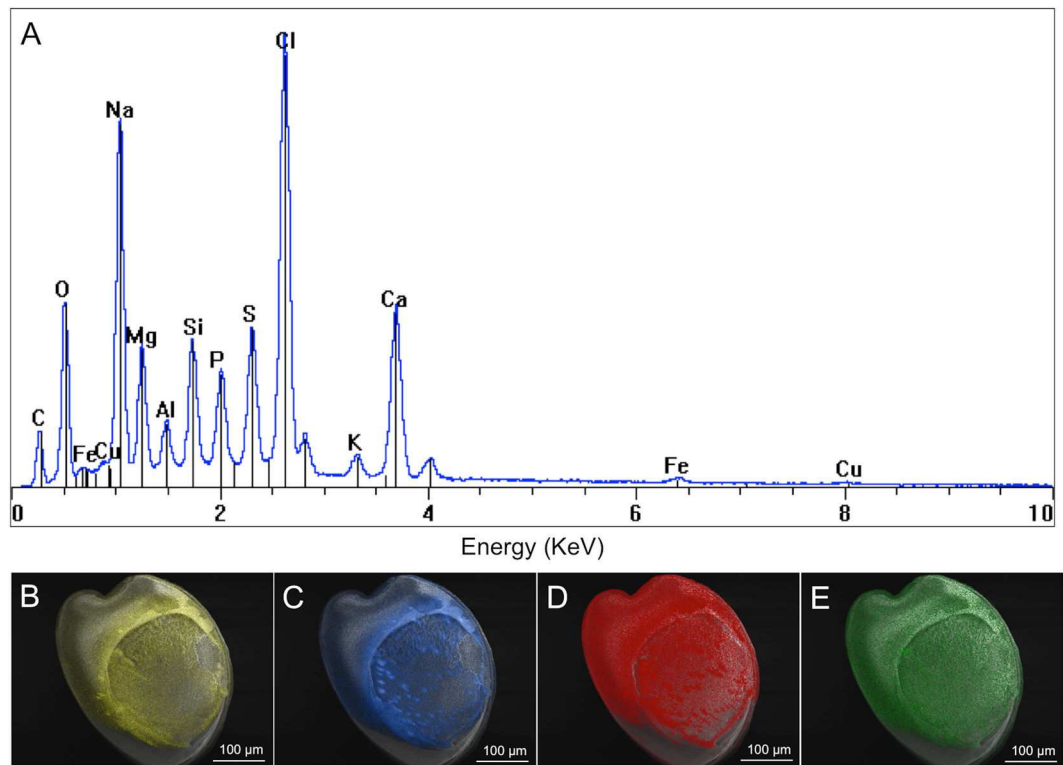


Figure 5. (A) Energy Dispersive X-ray spectroscopy (EDS) spectra of the adhesive footprint of *Crassostrea gigas* settled larvae. (B–E) EDS mapping of (B) sulfur, (C) chloride, (D) sodium, (E) potassium, in returned larvae after settlement.

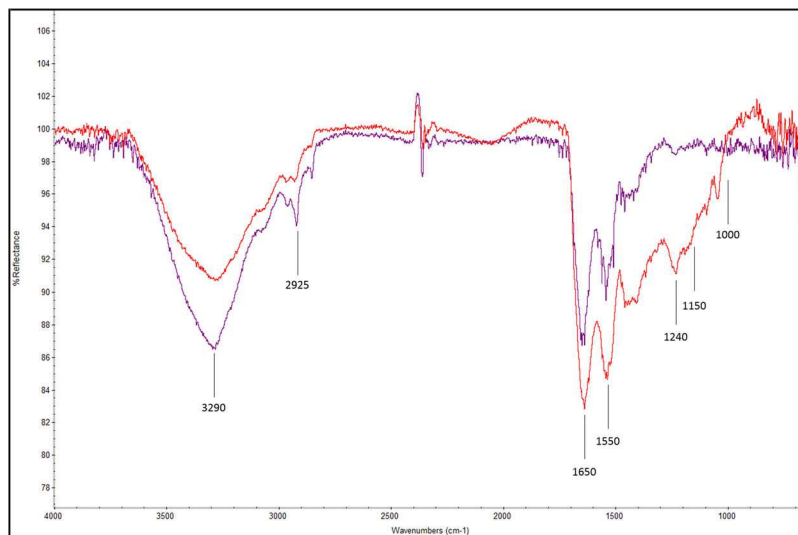


Figure 6. Fourier Transform Infrared Spectra of the adhesive footprint of *Crassostrea gigas* larvae in reflection mode. Red: inner zone of adhesive footprint. Blue: outer zone of adhesive footprint.

of *C. gigas* larval adhesive determined in this study by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) indicated the presence of sulfur, as shown in *P. canaliculus*³³ and *C. virginica* larval adhesive²⁸. Sulfur was reported to be implicated in disulfide bonds of adhesive proteins from several marine organisms^{34–38}. The presence of calcium, iron, and magnesium in the adhesive may indicate ionic interactions with these elements, which play a key role in some marine bioadhesives^{12,39}. Also, the phosphorus detection is in accordance with protein phosphorylation described in some bioadhesive mechanisms^{12,40,41}, but the absence of specific localisation during EDS mapping raised doubts about its real involvement in adhesion mechanisms. However, FTIR spectrum does not rule out the presence of phosphoserine vibrational bands in the region from 900–1200 cm^{-1} , encouraging further specific

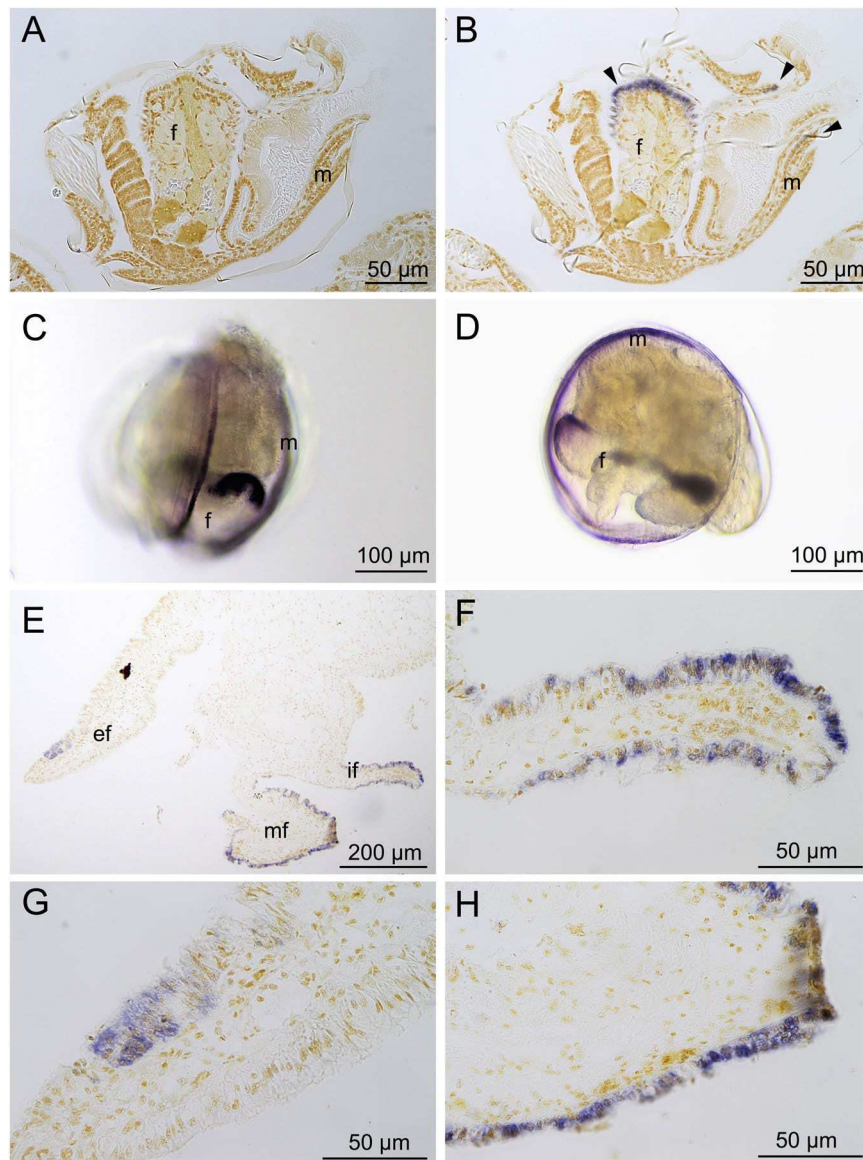


Figure 7. mRNA *in situ* hybridization of *Crassostrea gigas* foot mantle protein (*Cg_fmp*) in pediveliger larvae (A–D) and adults (E–H) in histological sections (A,B and E–H) and whole mounts (C,D). A: sense riboprobe hybridization (negative control). (B–H) Anti-sense riboprobe, blue coloration indicates the positive detection of *Cg_fmp* mRNA. (C) Ventral view of a pediveliger larva. (D) Left view of a pediveliger larva. (E) Adult mantle margin. (F) Inner fold of the mantle margin. (G) External fold of the mantle margin. (H) Middle fold of the mantle margin. f: foot, m: mantle, ef: external fold, mf: median fold, if: inner fold.

study concerning these protein modifications in oyster adhesive⁴². The presence of Mg in the adhesive could indicate complexation with phosphoproteins as observed in sandcastle worm adhesive⁴³. Small patches of sodium, chloride and potassium co-localisation in adhesive of *C. gigas* larvae indicated potential sea salt contamination.

The main challenge to investigating the protein composition of oyster larval adhesive by classical proteomic approaches was the very small amount of material produced. No results concerning specific protein extraction are presented in this study because of the tiny amount of material available and the difficulty of solubilizing the adhesive after its secretion and linkage to the substrate (see Supplementary Note). Alternatively, a direct tryptic digestion of adhesive footprints successfully resulted in the identification of 42 protein sequences, potentially implicated in adhesion. A quarter of these proteins have Gene Ontology annotation related to basal cellular functions, like DNA transcription or RNA processing, indicating their nuclear origin: plasminogen activator inhibitor 1 RNA, staphylococcal nuclease domain-containing 1-like, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like isoform X2, elongation factor 1- α , elongation factor 2, 60S acidic ribosomal P0, 60S ribosomal L5, 40S ribosomal S24 isoform X1 and partial histone H4. These proteins were most probably not from the final adhesive secretion and were not a component of the adhesive footprints. Plasminogen activator inhibitor 1 RNA function in *Crassostrea gigas* is not known, but this protein has a specific domain of nucleotide binding indicating

a potential role in RNA regulation or RNA stability. The Staphylococcal nuclease domain-containing 1-like is a coactivator of a transcription factor. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein is also known as a transcription factor. Elongation factor can act as a transcription factor and could be implicated in the regulation of protein maturation. Ribosomal subunits were detected in our sample. Ribosomes are directly implicated in RNA translation for protein synthesis. Histones are involved in chromatin structure. The presence of proteins implicated in DNA transcription and RNA processing indicate high transcription activity at this larval stage. At the pediveliger stage, larvae synthesize the adhesive in the foot gland, which represents a high volume of the larval body. At this stage, this organ is probably the one of the most active in DNA transcription and RNA processing. However, adhesive synthesis is a short term process, because there are only a few days between reaching the pediveliger stage (at 15 days post fertilization at 25 °C) and settlement. Additionally, larval metamorphosis is prepared for during the pediveliger stage and begins a few hours after settlement. During metamorphosis, the foot disappears totally. Proteins implicated in DNA transcription and RNA processing presumably play an important role in the different steps of larval crawling, settlement and metamorphosis.

Interestingly, proteins implicated in protein synthesis and the carbohydrate cycle were also detected: phosphoenolpyruvate carboxykinase-like, disulfide isomerase and disulfide isomerase A3, fructose-bis-phosphate aldolase, aldolase, 14-3-3 zeta/epsilon and peptidyl-prolyl cis trans isomerase-like. Disulfide isomerase, located in the endoplasmic reticulum, catalyses the rearrangement of di-sulfide bonds and interacts with protein glycosylation. This protein was also detected in the proteome of the tube feet adhesive organs of sea urchin⁴⁴. The presence of this enzyme involved in post-translational modifications of proteins is in accordance with sulfur detection in adhesive by EDS analysis. The disulfide bond could play a major role in adhesion mechanisms. Fructose-bis-phosphate aldolase could act as scaffolding protein⁴⁵. 14-3-3 zeta/epsilon are binding proteins involved in transmission pathway or protein assembly. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase binds to and isomerizes specific phosphorylated Ser/Thr-Pro (pSer/Thr-Pro) motifs by inducing conformational changes in a subset of phosphorylated proteins and acts as a molecular switch in multiple cellular processes. The presence of proteins involved in protein synthesis, in relation with the presence of proteins involved in DNA and RNA processing, indicates the high cellular activity of the foot. These proteins are potentially involved in adhesive protein complexation or in adhesive secretion.

Muscular cells constitutive proteins were also detected: filamin A-like isoform X1 and X4, myosin (probably from adductor muscle), actin A3a cytoplasmic, actin alpha-sarcomeric-like isoform X1, paramyosin-like isoform X1, transketolase, intermediate filament, tubulin alpha and beta chain, tropomyosin isoform X6 and gelsolin. Contractions of the foot during crawling phase are made possible by the presence of foot muscles observed in the histological preparations and previously described in oyster pediveliger larvae¹¹. Also, proteins involved in cellular energy pathways could come from muscular activity of the foot: fructose-bis-phosphate aldolase, aldolase, arginine kinase, sarcoplasmic calcium binding protein and ATP synthase. Behaviour observations of pediveliger larvae suggest that muscle has an important function during settlement. However, the muscle proteins found in our analysis probably came from cellular contamination of the substrate, and not from the final adhesive.

Among the 42 proteins identified, one predicted uncharacterized protein was detected, which we named *Cg_fmp*. This predicted protein is a sequence of 298 amino acid comprising 20 amino acid that are a peptide signal indicating potential extracellular export or a membrane localization. No conserved domain was detected in this sequence. The 12 amino acid sequence at position 148, which includes 10 glutamates, could lead to an intrinsically disordered region⁴⁶. The region between positions 149 to 181 shows a coiled domain prediction, but this domain does not provide information about the role of *Cg_fmp*. However, an 8 amino acid sequence of consecutive prolines, at position 65, could form polyproline II helix^{47,48}. These hydrophobic structures are often involved in protein interactions and protein complex assembly and have been described in terrestrial and marine bioadhesive proteins¹². Also, the predictive pI of 4.78 of the *Cg_fmp* protein indicates a high negative charge density and “hard” metal-binding ligands. Divalent metal cation (esp. calcium) binding sites have been reported in adhesive proteins^{12,49–51}. It is noteworthy that the mRNA level pattern data from Zhang *et al.*²³ indicates that this gene is strongly expressed at the pediveliger stage. Localization of the expression of the *Cg_fmp* gene in the epithelial cells of the tip of the foot of *C. gigas* pediveliger larvae indicates a potentially close relationship between the biological role of *Cg_fmp* protein and the crawling phase. However, the expression of the *Cg_fmp* gene in larval and adult mantle showed that activity of the gene was more diversified. Even though the localization in mantle epithelial cells is the same for larvae and adults, alternative splicing of *Cg_fmp* RNA could be different between these stages, resulting in splice variants with different physiological properties⁵². Although the precise role of the *Cg_fmp* could not be assessed using mRNA *in situ* hybridization, some hypotheses could be formulated:

- (i) *Cg_fmp* protein could be localized in the membrane of epithelial cells, participating in the transmission of external stimuli to nerve cells.
- (ii) In addition, *Cg_fmp* could be involved in temporary adhesive composition, or secretion by vesicle trafficking.

The tip of the foot probably has a sensitive function; nerves are present from the base of the foot with pedal ganglia reaching to the tip of the foot with neuronal extensions. During crawling, the cilia overwriting at the tip of the foot of *C. gigas* larvae indicates a close relation between this zone and the substrate. Crawling is essential because it allows oyster larvae to choose a habitat for their whole lives. In addition, settlement is closely mediated by neurotransmitters^{53,54}, which could be detected by *Cg_fmp* as sensitive receptor. Detection of the *Cg_fmp* transcript in the mantle also supports the hypothesis that this protein has a sensitive function. The mantle presents cells and muscles mediating specific behaviour in response to environmental stimuli^{11,26,55}.

However, the localization of *Cg_fmp* expression in the mantle margin of larvae and adults and in the tip of the larval foot potentially indicates a dual role of the *Cg_fmp* protein. In *O. edulis*, it was shown that the mantle produces final adhesive deposition after foot secretion during larval settlement^{21,24}. However, the main role of the oyster mantle is to secrete shell during larval and adult stages¹¹. Oyster shell is composed of an inorganic and an organic part, the periostracum. *Cg_fmp* protein could have an adhesive function in the latter at the larval stage. However, the epidermis cells stained in the adult mantle are not those known to secrete the periostracum. Cells stained in the outer mantle margin link the mantle to the shell. Also, cells stained in the middle and inner fold could have adhesive properties. Oysters could modulate water flow by closing the pallial curtain with the middle and inner mantle folds⁵⁵.

Adhesive properties of *Cg_fmp* protein are also supported in crawling behaviour. Crawling is characterized by temporary attachment of the foot mediated by temporary adhesive secretion at the tip of the foot. These secretions were described by Cranfield in *O. edulis*, with the presence of glands opening at the tip of the foot (gland B)²⁵. The vesicles observed by SEM at the base of the cilia of the foot tip in *C. gigas* probably result from secretion by this gland. The hypothesis of temporary adhesive secretion by vesicle liberation during the crawling phase implies the role of vesicle mediated transport, and secretion mechanisms with a membrane docking protein. Structural proteins, like intermediate filaments and proteins involved in protein post-translational modification such as peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase, could be related to it. Studies on temporary marine adhesive were performed in echinoderms^{44,56–60}. A similar proteomic approach was used on urchin *Paracentrus lividus* adhesive footprints, showing cellular and structural proteins from muscle, and proteins from DNA and RNA processing, like histones^{44,59}. Temporary adhesion implies the loss of cells and epidermis fragments on the substrate during detachment. SEM observations of crawling larvae revealed that the strongly ciliated foot of *C. gigas* shows cilia overwriting because of foot pressure on the substrate during crawling. In mussels, cilia play a key role in environmental exploration and byssus formation⁶¹. Reversible adhesion of the foot probably results in the loss of cilia and epidermis fragments on the substrate during crawling. Additionally, valve contractions observed at the final adhesive release could scrape cilia from the foot and distribute the debris in the final adhesive. In *O. edulis* adhesive footprints, transmission electron microscopy observation indicated the presence of cilia in the final adhesive secretion²¹. This hypothesis is supported by our detection of four proteins presenting a potential role in cylogenesis (microtubule-associated-like 2 isoform X3, dynein, filamin A-like isoform X1 and X4). Furthermore, proteins implicated in cellular energy could also result from the foot cilia activity.

Our study is the first time a proteomic approach has been successfully performed on *C. gigas* adhesive, revealing 42 proteins potentially implicated in adhesion. The transcript of one uncharacterized proteins, named *Cg_fmp* for *Crassostrea gigas* foot mantle protein, was successfully located in the tip of the foot and in the mantle of pediveliger larvae, probably indicating its role in crawling, as well as in adult mantle, indicating a physiological role at the adult stage. The precise role of this protein needs to be investigated in greater depth using functional molecular approaches. Gene Ontology of the 42 detected proteins and cellular location of the *Cg_fmp* mRNA indicate that these proteins came from oyster cells lost during crawling and probably not from the final adhesive structure. A probable explanation for the detection of cellular proteins in the adhesive analysis is the method employed. This analysis was performed on the total substrate after removal of larvae, and the adhesive footprint seems to remain insensitive to trypsin digestion. Binocular observation of the adhesive footprint, before and after digestion, did not reveal any major changes in its shape. However, contrary to other preliminary tests with an aggressive protein extraction technique (see Supplementary Note), this approach permitted, despite the small amount of available material, to detect proteins involved in the crawling phase of *C. gigas* larvae. It is probably not possible to extract proteins from adhesive footprints because of the insolubility of the secreted and complexed material. Further investigation is needed on the composition of larval oyster adhesive. Laser capture microdissection techniques, which would allow samples to be taken of the foot gland containing adhesive precursors, would be an interesting way to characterise larval adhesive. The first knowledge needed will be the molecular composition of larval adhesive and its mechanistic interactions with its environment. These will potentially allow biotechnological applications of this material. Studies on the chemical mechanics of adhesion will also be necessary to fully describe oyster larval adhesion strategies.

Methods

Biological material and larval rearing. *Crassostrea gigas* is class *Bivalvia*, and family *Ostreidae*. *C. gigas* larvae were produced at the Ifremer hatchery facilities in Argenton (France) as described in Petton *et al.* (2013)⁶². Larvae were maintained at 25 °C, 34 PSU, pH 8.2 to 8.3, 95 to 100% saturated O₂ and fed *ad libitum* on a mix of microalgae (*Tisochrysis lutea* and *Chaetoceros sp.* strain CCAP 1010-3). A constant concentration of 1500 µm³. µl⁻¹ microalgae was maintained at the exit of each 5-L flow-through rearing tank⁶³, leading to production of a mean number of 250 000 ready to settle larvae per tank (corresponding to 50 larvae per mL). At 14 days post fertilization, pediveliger larvae were sampled and placed in a settlement tank with micro-ground shell. In order to capture ready-to-settle larvae for further analysis, specific substrates were placed in the settlement tank: frosted glass (for microscopy observation and proteomic analysis) or polished inox 316L (for FTIR analysis). The readiness to settle of larvae was checked by binocular observation (magnification × 50).

Scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray analysis. Crawling and settled larvae (n = 1000) were anesthetized with 5% MgCl₂ for 30 min⁶⁴. Samples were fixed in a 1.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer (1.75% w/v of NaCl, pH 7.2) at 4 °C for 2 h. Samples were washed three times in a solution of 0.1 M sodium cacodylate and dehydrated by successive immersion in alcoholic (50–70–90–100%) and alcoholic hexamethyldisilazane (HMDS) (v:v), absolute ethanol:HMDS (3:1), absolute ethanol:HMDS (1:1), absolute ethanol:HMDS (1:3), and pure HMDS. For visualization of the adhesive, one hundred larvae were taken off the substrate using micro-forceps, then turned over and stuck on adhesive carbon tape. Finally, the samples were

coated with gold palladium, or with carbon for energy dispersive X-ray analysis. The larvae were then observed by scanning electron microscopy (Hitachi S-3200N).

Histology. To describe foot anatomy, histological preparations were made of *C. gigas* pediveliger larvae. Crawling larvae ($n = 1000$) were anesthetized with 5% $MgCl_2$ for 30 min⁶⁴. Samples were fixed in a modified Davidson fixative (12% v/v formaldehyde, 15% v/v ethanol and 5% v/v acetic acid for 24 h at 4 °C. Fixed larvae were decalcified with a solution of 3% ascorbic acid for 12 h⁶⁵. The larvae were then dehydrated by successive immersion in an alcoholic series (50–70–90–100%) and claral[®] and embedded in paraffin. Serial sections of 5 μm were made on a microtome. Histological sections were stained with haematoxylin and eosin to allow visualization of anatomical structures⁶⁶. To visualize proteins and polysaccharides content, sections were also stained with a multichrome technic (Alcian Blue, Periodic Acid–Schiff's, Haematoxylin and Picric Acid)⁶⁷. Sections were dehydrated with serial baths of alcoholic solutions (50–70–90–100%) and mounted in Eukitt medium. Images were captured with an inverted microscope Zeiss AxioObserver Z1 and a Canon EOS 750D Camera.

Fourier transform infrared spectroscopy. To assess the chemical composition of the adhesive, a Fourier Transform InfraRed spectroscopy (FTIR) analysis was made. One cm^2 polished stainless steel 316 L plaques were placed in the settlement tank containing pediveliger larvae. After 48 h, these plaques were removed, rinsed with distilled water and dried. Adhered larvae were removed from the plaques with micro-forceps under a binocular microscope. All spectra were recorded by an FTIR microscope used in reflection mode. The FTIR microscopy measurements were performed with a Thermo IS50 infrared spectrometer coupled with an infrared Thermo Continuum microscope with a 32x IR objective and a Mercury Cadmium Telluride (MCT) single element detector cooled with liquid nitrogen. Each spectrum was obtained by 65 scans recorded at a resolution of 4 cm^{-1} .

Tryptic digestion and MALDI-TOF/TOF analyses. Freeze-dried adhered larvae were removed from the frosted glass and the maximum contaminant material (faeces, algal deposits) was scraped off with micro-forceps under a binocular microscope. Before analysis, any attached larvae and debris were meticulously removed from the substrate to prevent cellular contamination of sample. One cm^2 of frosted glass coated with around 300 adhesive footprints was digested with 20 μg of trypsin in 3 mL of 100 mM triethylammonium bicarbonate buffer at 37 °C under gentle agitation for 24 h. Supernatant was transferred into microtubes, evaporated and conserved at –80 °C until analysis. Digestion was repeated for three different glass pieces.

Samples were re-suspended in TFA 0.1% before nano-LC fractionation. The chromatography step was performed on a nano-LC system (Prominence, Shimadzu). Peptides were concentrated on a Zorbax[®] 5 \times 0.3 mm C18 precolumn (Agilent) and separated on a Zorbax 150 \times 75 μm C18 column (Agilent). Mobile phases consisted of 0.1% trifluoroacetic acid, 99.9% water (v/v) (A) and 0.1% trifluoroacetic acid in 99.9% ACN (v/v) (B). The nanoflow rate was set at 300 $nL \cdot min^{-1}$, and the gradient profile was as follows: constant 2% B for 5 min, from 2 to 5% B in 1 min, from 5 to 32% B in 144 min, from 32 to 70% B in 10 min, from 70 to 90% B in 5 min and a return to 2% B in 10 min. The 300 $nL \cdot min^{-1}$ volume of the peptide solution was mixed with 1.2 $\mu L \cdot min^{-1}$ volumes of solutions of 5 $mg \cdot mL^{-1}$ CHCA matrix prepared in a diluted solution of 50% ACN with 0.1% TFA. Twenty second fractions were spotted with an AccuSpot spotter (Shimadzu) on a stainless steel Opti-TOF[™] 384 target.

MS experiments were carried out on an AB Sciex 5800 proteomics analyser equipped with TOF/TOF ion optics and an OptiBeam[™] on-axis laser irradiation with 1000 Hz repetition rate. The system was calibrated immediately before analysis with a mixture of des-Arg-Bradykinin, Angiotensin I, Glu1-Fibrinopeptide B, ACTH (18–39), ACTH (7–38), and mass precision was greater than 50 ppm. All acquisitions were made in automatic mode. A laser intensity of 3400 was typically employed for ionizing. MS spectra were acquired in positive reflector mode by combining 1000 single spectra (5 \times 200) in the mass range from 700 to 4000 Da. MS/MS spectra were acquired in the positive MS/MS reflector mode by combining a maximum of 2500 single spectra (10 \times 250) with a laser intensity of 4300. For the tandem MS experiments, the acceleration voltage applied was 1 kV and air was used as the collision gas, with gas pressure set to medium.

The fragmentation pattern was used to determine the sequence of the peptide. Database searching was performed using the Mascot 2.5.1 program (Matrix Science) on the dedicated database of *C. gigas* (28 028 proteins). The variable modifications allowed were as follows: C-Carbamidomethyl, K-acetylation, methionine oxidation, and dioxidation. “Trypsin” was selected and two miscleavages were also allowed. Mass accuracy was set to 200 ppm and 0.6 Da for MS and MS/MS mode, respectively. Common sequences from three replicates were isolated and identified. Functional annotation was performed with BLAST2GO 4.0.7 software. For each sequence, the RNA expression profile was visualized with Supplementary Table S14 from the oyster genome publication by Zhang *et al.*²³. For each gene sequence, the number of Reads Per Kilobase Million (RPKM) was plotted by development stage.

mRNA *in situ* hybridization. One of the proteins identified by the proteomic approach was selected as a candidate for mRNA *in situ* hybridization (ISH) to locate the tissue expression of the gene encoding this protein. One fragment of 596 bp from position 162 to position 757 of the cDNA (XM_011428314.1 PREDICTED: *Crassostrea gigas* uncharacterized LOC105327706 (LOC105327706), mRNA) was amplified by RT-PCR using total RNA previously extracted from pediveliger *C. gigas* with TRI-Reagent[®] according to manufacturer's instructions. Riboprobe synthesis was performed as described by Fabioux *et al.*⁶⁸. The amplified fragment of cDNA was sub-cloned in a pCR4-TOPO plasmid, transformed in *E. coli* TOP10 bacteria and purified. After *in vitro* transcription of linearized plasmid, sense and antisense DIG-tagged ssRNA probes were purified. Hybridization with sense riboprobe was used as a negative control.

Histological preparation of pediveliger larvae was performed according to the protocol previously described for histological coloration. ISH on histological preparations was made according to Boullot *et al.*⁶⁹. The whole

mount ISH (WISH) protocol was performed according to Nederbragt *et al.*⁷⁰ and Jackson *et al.*⁷¹. Hybridization was performed with 500 pg μL^{-1} of labelled riboprobe at 65 °C. The sample were stained with anti-digoxigenin antibody coupled to alkaline phosphatase. Revelation was made with NBT (nitro blue tetrazolium) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate) in the dark at 35 °C. Images were captured with an inverted microscope Zeiss AxioObserver Z1 and a Canon EOS 750D Camera.

References

1. Wahl, M. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **58**, 175–189 (1989).
2. Dreanno, C., Kirby, R. R. & Clare, A. S. Smelly feet are not always a bad thing: the relationship between cyprid footprint protein and the barnacle settlement pheromone. *Biol. Lett.* **2**, 423–425 (2006).
3. Dreanno, C. *et al.* An α 2-macroglobulin-like protein is the cue to gregarious settlement of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 14396–14401 (2006).
4. Von Byern, J. & Grunwald, I. Biological adhesive systems. *Vienna Springer Vienna* (2010).
5. Smith, A. M. & Callow, J. A. *Biological adhesives*. **23**, (Springer, 2006).
6. Alberts, E. M. *et al.* Structural and compositional characterization of the adhesive produced by Reef Building Oysters. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 8533–8538 (2015).
7. Metzler, R. A., Rist, R., Alberts, E., Kenny, P. & Wilker, J. J. Composition and structure of oyster adhesive reveals heterogeneous materials properties in a biological composite. *Adv. Funct. Mater.* **26**, 6814–6821 (2016).
8. Gohad, N. V. *et al.* Synergistic roles for lipids and proteins in the permanent adhesive of barnacle larvae. *Nat. Commun.* **5** (2014).
9. Fletcher, R. L. & Callow, M. E. The settlement, attachment and establishment of marine algal spores. *Br. Phycol. J.* **27**, 303–329 (1992).
10. Waite, J. H. Nature's underwater adhesive specialist. *Int. J. Adhes. Adhes.* **7**, 9–14 (1987).
11. Bayne, B. L. *Biology of Oysters*. (Elsevier Science, 2017).
12. Hennebert, E., Maldonado, B., Ladurner, P., Flammang, P. & Santos, R. Experimental strategies for the identification and characterization of adhesive proteins in animals: a review. *Interface Focus* **5**, 20140064–20140064 (2014).
13. Oliveira, D. & Granhag, L. Matching forces applied in underwater hull cleaning with adhesion strength of marine organisms. *J. Mar. Sci. Eng.* **4**, 66 (2016).
14. North, M. A., Del Grosso, C. A. & Wilker, J. J. High strength underwater bonding with polymer mimics of mussel adhesive proteins. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 7866–7872 (2017).
15. Foster, L. J. R. Bioadhesives as surgical sealants: A Review. *Bioadhesion Biomim. Nat. Appl.* **203** (2015).
16. Waite, J. H. & Tanzer, M. L. The bioadhesive of *Mytilus byssus*: a protein containing L-dopa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**, 1554–1561 (1980).
17. Waite, J. H. The formation of mussel byssus: anatomy of a natural manufacturing process. In *Structure, cellular synthesis and assembly of biopolymers* 27–54 (Springer, 1992).
18. Hwang, D. S., Gim, Y., Kang, D. G., Kim, Y. K. & Cha, H. J. Recombinant mussel adhesive protein Mgfp-5 as cell adhesion biomaterial. *J. Biotechnol.* **127**, 727–735 (2007).
19. Lee, B. P., Messersmith, P. B., Israelachvili, J. N. & Waite, J. H. Mussel-inspired adhesives and coatings. *Annu. Rev. Mater. Res.* **41**, 99–132 (2011).
20. Gosling, E. Reproduction, Settlement and Recruitment. in *Bivalve Molluscs* 131–168, <https://doi.org/10.1002/9780470995532.ch5> (Blackwell Publishing Ltd, 2007).
21. Cranfield, H. J. The ultrastructure and histochemistry of the larval cement of *Ostrea edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **55**, 497–503 (1975).
22. Cranfield, H. J. A study of the morphology, ultrastructure, and histochemistry of the food of the pediveliger of *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.* **22**, 187–202 (1973).
23. Zhang, G. *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation. *Nature* **490**, 49–54 (2012).
24. Cranfield, H. J. Observations on the behaviour of the pediveliger of *Ostrea edulis* during attachment and cementing. *Mar. Biol.* **22**, 203–209 (1973).
25. Cranfield, H. J. Observations on the function of the glands of the foot of the pediveliger of *Ostrea edulis* during settlement. *Mar. Biol.* **22**, 211–223 (1973).
26. Kennedy, V. S., Newell, R. I. & Eble, A. F. *The eastern oyster: Crassostrea virginica*. (University of Maryland Sea Grant College, 1996).
27. Elston, R. Functional anatomy, histology and ultrastructure of the soft tissues of the larval American oyster *Crassostrea virginica*. *Proc Nation Shellfish Assoc* **70**, 65–93 (1980).
28. Tibabuzo Perdomo, A. M. *et al.* Changes in Cementation of Reef Building Oysters Transitioning from Larvae to Adults. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 14248–14253 (2018).
29. Petrone, L., Ragg, N. L. C. & McQuillan, A. J. *In situ* infrared spectroscopic investigation of *Perna canaliculus* mussel larvae primary settlement. *Biofouling* **24**, 405–413 (2008).
30. Gao, Z., Bremer, P. J., Barker, M. F., Tan, E. W. & McQuillan, A. J. Adhesive secretions of live mussels observed *in situ* by attenuated total reflection–infrared spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **61**, 55–59 (2007).
31. Aldred, N. & Petrone, L. Progress in the Study of Adhesion by Marine Invertebrate Larvae. in *Biological Adhesives* (ed. Smith, A. M.) 87–105, https://doi.org/10.1007/978-3-319-46082-6_4 (Springer International Publishing, 2016).
32. Nicklisch, S. C. & Waite, J. H. Mini-review: The role of redox in Dopa-mediated marine adhesion. *Biofouling* **28**, 865–877 (2012).
33. Petrone, L., Ragg, N. L. C., Girvan, L. & James McQuillan, A. Scanning electron microscopy and energy dispersive X-Ray microanalysis of *Perna canaliculus* mussel larvae adhesive secretion. *J. Adhes.* **85**, 78–96 (2009).
34. Flammang, P. Adhesive secretions in echinoderms: an overview. *Biol. Adhes.* 183–206 (2006).
35. Sun, C. & Waite, J. H. Mapping chemical gradients within and along a fibrous structural tissue, mussel byssal threads. *J. Biol. Chem.* **280**, 39332–39336 (2005).
36. Wiegemann, M. Adhesion in blue mussels (*Mytilus edulis*) and barnacles (genus *Balanus*): mechanisms and technical applications. *Aquat. Sci.-Res. Boundaries* **67**, 166–176 (2005).
37. Favi, P. M., Yi, S., Lenaghan, S. C., Xia, L. & Zhang, M. Inspiration from the natural world: from bio-adhesives to bio-inspired adhesives. *J. Adhes. Sci. Technol.* **28**, 290–319 (2014).
38. Petrone, L., Easingwood, R., Barker, M. F. & McQuillan, A. J. *In situ* ATR-IR spectroscopic and electron microscopic analyses of settlement secretions of *Undaria pinnatifida* kelp spores. *J. R. Soc. Interface* **8**, 410–422 (2011).
39. Priemel, T., Degtyar, E., Dean, M. N. & Harrington, M. J. Rapid self-assembly of complex biomolecular architectures during mussel byssus biofabrication. *Nat. Commun.* **8**, 14539 (2017).
40. Dickinson, G. H. *et al.* Localization of phosphoproteins within the barnacle adhesive interface. *Biol. Bull.* **230**, 233–242 (2016).
41. Flammang, P., Lambert, A., Bailly, P. & Hennebert, E. Polyphosphoprotein-containing marine adhesives. *J. Adhes.* **85**, 447–464 (2009).
42. Petrone, L. Molecular surface chemistry in marine bioadhesion. *Adv. Colloid Interface Sci.* **195–196**, 1–18 (2013).

43. Stewart, R. J., Wang, C. S., Song, I. T. & Jones, J. P. The role of coacervation and phase transitions in the sandcastle worm adhesive system. *Adv. Colloid Interface Sci.* **239**, 88–96 (2017).
44. Santos, R., Barreto, Á., Franco, C. & Coelho, A. V. Mapping sea urchins tube feet proteome — A unique hydraulic mechano-sensory adhesive organ. *J. Proteomics* **79**, 100–113 (2013).
45. Sherawat, M., Tolan, D. R. & Allen, K. N. Structure of a rabbit muscle fructose-1, 6-bisphosphate aldolase A dimer variant. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **64**, 543–550 (2008).
46. Van Der Lee, R. *et al.* Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem. Rev.* **114**, 6589–6631 (2014).
47. Williamson, M. P. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J.* **297**, 249 (1994).
48. Burkhard, P., Stetefeld, J. & Strelkov, S. V. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol.* **11**, 82–88 (2001).
49. Inoue, K., Takeuchi, Y., Miki, D. & Odo, S. Mussel adhesive plaque protein gene is a novel member of epidermal growth factor-like gene family. *J. Biol. Chem.* **270**, 6698–6701 (1995).
50. Hennebert, E. *et al.* Sea star tenacity mediated by a protein that fragments, then aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 6317–6322 (2014).
51. Liu, C., Xie, L. & Zhang, R. Ca²⁺ mediates the self-assembly of the foot proteins of *Pinctada fucata* from the nanoscale to the microscale. *Biomacromolecules* **17**, 3347–3355 (2016).
52. Lind, U. *et al.* Molecular characterization of the α -subunit of Na⁺/K⁺ ATPase from the euryhaline barnacle *Balanus improvisus* reveals multiple genes and differential expression of alternative splice variants. *PLoS One* **8**, e77069 (2013).
53. Coon, S. L., Bonar, D. B. & Weiner, R. M. Induction of settlement and metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), by L-DOPA and catecholamines. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **94**, 211–221 (1985).
54. Bonar, D. B., Coon, S. L., Walch, M., Weiner, R. M. & Fitt, W. Control of oyster settlement and metamorphosis by endogenous and exogenous chemical cues. *Bull. Mar. Sci.* **46**, 484–498 (1990).
55. Galtsoff, P. S. The american oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fish Bull.* **64**, 421–425 (1964).
56. Hennebert, E., Wattiez, R., Waite, J. H. & Flammang, P. Characterization of the protein fraction of the temporary adhesive secreted by the tube feet of the sea star *Asterias rubens*. *Biofouling* **28**, 289–303 (2012).
57. Hennebert, E., Wattiez, R. & Flammang, P. Characterisation of the carbohydrate fraction of the temporary adhesive secreted by the tube feet of the sea star *Asterias rubens*. *Mar. Biotechnol.* **13**, 484–495 (2011).
58. Hennebert, E., Leroy, B., Wattiez, R. & Ladurner, P. An integrated transcriptomic and proteomic analysis of sea star epidermal secretions identifies proteins involved in defense and adhesion. *J. Proteomics* **128**, 83–91 (2015).
59. Santos, R. *et al.* First insights into the biochemistry of tube foot adhesive from the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinoidea, Echinodermata). *Mar. Biotechnol.* **11**, 686–698 (2009).
60. Hennebert, E., Viville, P., Lazzaroni, R. & Flammang, P. Micro- and nanostructure of the adhesive material secreted by the tube feet of the sea star *Asterias rubens*. *J. Struct. Biol.* **164**, 108–118 (2008).
61. Andrade, G. R. *et al.* Functional Surface of the golden mussel's foot: morphology, structures and the role of cilia on underwater adhesion. *Mater. Sci. Eng. C* **54**, 32–42 (2015).
62. Petton, B., Pernet, F., Robert, R. & Boudry, P. Temperature influence on pathogen transmission and subsequent mortalities in juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquac. Environ. Interact.* **3**, 257–273 (2013).
63. Da Costa, F., Robert, R., Quéré, C., Wilkfors, G. H. & Soudant, P. Essential fatty acid assimilation and synthesis in larvae of the bivalve *Crassostrea gigas*. *Lipids* **50**, 503–511 (2015).
64. Suquet, M. *et al.* Anesthesia in Pacific oyster. *Crassostrea gigas*. *Aquat. Living Resour.* **22**, 29–34 (2009).
65. Audino, J. A., Marian, J. E. A. R., Kristof, A. & Wanninger, A. Inferring muscular ground patterns in Bivalvia: Myogenesis in the scallop *Nodipecten nodosus*. *Front. Zool.* **12** (2015).
66. Gabe, M. *Techniques histologiques*. (Masson Paris, 1968).
67. Costa, P. M. & Costa, M. H. Development and application of a novel histological multichrome technique for clam histopathology. *J. Invertebr. Pathol.* **110**, 411–414 (2012).
68. Fabioux, C., Pouvreau, S., Roux, F. L. & Huvet, A. The oyster vasa-like gene: a specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 897–904 (2004).
69. Boullot, F. *et al.* Molecular characterization of voltage-gated sodium channels and their relations with paralytic shellfish toxin bioaccumulation in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Drugs* **15**, 21 (2017).
70. Nederbragt, A. J., van Loon, A. E. & Dictus, W. J. A. G. Expression of *Patella vulgata* orthologs of engrailed and dpp-BMP2/4 in adjacent domains during molluscan shell development suggests a conserved compartment boundary mechanism. *Dev. Biol.* **246**, 341–355 (2002).
71. Jackson, D. J. *et al.* A rapidly evolving secretome builds and patterns a sea shell. *BMC Biol.* **4**, 40 (2006).

Acknowledgements

The authors thank all the people who contributed to this work: Isabelle Queau, Jacqueline Le Grand, Justine Castrec, Kevin Tallec and Mathias Huber, for oyster reproduction and maintenance; Marc Suquet, Stéphane Pouvreau, Carole Di Poi, for discussions on oyster larvae behaviour; Anne Donval for electron microscopy; and Jean-Philippe Buffet for protein extraction. This work was supported by the European Institute for Marine Studies (IUEM-France), University of Western Brittany, local government (CR Bretagne) and by the “Laboratoire d’Excellence” LabexMER (ANR-10-LABX-19). It was co-funded by a grant from the French government under the program “Investissements d’Avenir”.

Author Contributions

V.F., S.A., P.B., C.H. and E.G. wrote the main manuscript text. B.P. produced the biological material. V.F., S.A. and B.B. performed the proteomic analysis. V.F. and P.E. performed the microscopy analysis. V.F. and K.B. performed the FTIR analysis. V.F., M.B., C.F. did the mRNA *in situ* hybridization. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33720-4>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Titre : Étude du phénomène d'adhésion chez la larve d'huître creuse *Crassostrea gigas* au stade pédivéligère.

Mots clés : huître, larve pédivéligère, bioadhésion, microscopie, protéomique.

Résumé : Les huîtres présentent un cycle de vie en deux phases : les larves pélagiques s'adhèrent avant de se métamorphoser pour une vie benthique. L'adhésion larvaire se fait au stade pédivéligère par sécrétion d'un bioadhésif produit par un organe spécialisé : le pied. Bien que l'huître *Crassostrea gigas* soit un organisme d'importance économique et écologique, et un modèle d'étude en biologie marine, le phénomène d'adhésion chez la larve pédivéligère est peu documenté. Une étude morphologique des larves pédivéligères par histologie et microscopie électronique a été réalisée, afin de décrire les glandes responsables de la sécrétion de l'adhésif. Une composition majoritairement protéique de l'adhésif a été révélée par histochimie et spectroscopie FTIR. Une analyse *in silico* des données transcriptomiques

disponibles chez *C. gigas* a permis d'identifier des gènes probablement impliqués dans l'adhésion. Deux analyses protéomiques, menées sur les larves entières et l'adhésif sécrété ont permis de caractériser des protéines en lien avec la biosynthèse et la structure de l'adhésif. Une protéine de type collagène apparaît impliquée dans la structure de l'adhésif de *C. gigas*. Cette première approche de l'étude de l'adhésion de *C. gigas*, permet d'envisager la valorisation biotechnologique des molécules identifiées. Le développement d'adhésifs biomimétiques, élaborés sur le principe des bioadhésifs marins, autoriserait le collage en milieu humide, et serait une alternative aux adhésifs synthétiques qui malgré leur toxicité, dominent le marché mondial.

Title: Study of the adhesion phenomenon in the Pacific oyster larvae *Crassostrea gigas* at the pediveliger stage.

Keywords: oyster, pediveliger larvae, bioadhesion, microscopy, proteomics.

Abstract: Oysters show a two-phase life cycle: pelagic larvae adhere before metamorphosis into benthic life. Larval adhesion occurs at the pediveliger stage by secretion of a bioadhesive produced by a specialized organ: the foot. The oyster *Crassostrea gigas* is an organism of economic and ecological importance, and a model for study in marine biology, but the phenomenon of adhesion in the pediveliger larvae is poorly documented. A morphological description of the pediveliger larvae by histology and electron microscopy was performed to describe the glands responsible for the secretion of the adhesive. A predominantly proteinaceous composition of the adhesive was revealed by histochemistry and FTIR spectroscopy. An *in silico* analysis of available

transcriptomic data from *C. gigas* was made to identify genes probably involved in adhesion. Two proteomic analyses, performed on whole larvae and on the secreted adhesive, characterizing proteins related to biosynthesis and adhesive structure. A collagen-like protein appears to be involved in the adhesive structure of *C. gigas*. This first approach to the study of the adhesion of *C. gigas* makes it possible to consider the biotechnological enhancement of the identified molecules. Despite their toxicity, synthetic adhesives dominate the world market. The development of biomimetic adhesives, based on marine bioadhesive strategies could be an alternative, and allowing furthermore bonding in wet condition.